



THESE DE DOCTORAT

Présentée au :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES

par :

Nawal TASSALI

Pour obtenir le grade de :

Docteur en sciences de l'Université de Versailles

Spécialité: Physique - Chimie

Section CNU: Biophysique et Imagerie Médicale

IRM moléculaire à base de xénon hyperpolarisé par laser

Soutenance le 8 Novembre 2012

Devant le Jury composé de :

M. Michel Luhmer

M. Michel Bardet

Mme Chantal Larpent

M. Xavier Maître

M. Thierry Brotin

M. Bernard Rousseau

M. Patrick Berthault

Université Libre de Bruxelles

CEA de Grenoble

Université de Versailles

Université Paris-Sud XI

ENS de Lyon

CEA de Saclay

CEA de Saclay

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

Remerciements

Je souhaite ici remercier et témoigner toute ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidé à aller au bout de cette aventure.

Ce travail de thèse s'est déroulé au Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay dans le Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique Nucléaire.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur Patrick Berthault, pour la confiance qu'il m'a accordée en me choisissant pour réaliser ce travail et pour ces 3 années qu'il a consacré à diriger cette thèse. J'aimerais lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité, sa générosité, son aide et son soutien de chaque instant ainsi que ses relectures constantes de ce mémoire. Merci Patrick pour tout ce que tu m'as appris et tout ce que tu as fait pour moi et merci de m'avoir acceptée telle que j'étais avec mes 5 quotidiennes... Ton ouverture d'esprit et tes qualités humaines font de toi un chercheur et un responsable aux qualités humaines exceptionnelles. Je t'exprime ici toute ma gratitude et les mots ne suffiront pas pour exprimer à quel point je te suis reconnaissante.

Je souhaiterais ensuite remercier Monsieur Michel Bardet du CEA de Grenoble et Monsieur Michel Luhmer de l'Université Libre de Bruxelles pour avoir accepté la fonction de rapporteur. Je remercie également Madame Chantal Larpent de l'Université de Versailles, ainsi que Messieurs Thierry Brotin de l'ENS de Lyon, Xavier Maître de l'Université Paris-Sud 11 et Bernard Rousseau du CEA de Saclay pour avoir participé à mon jury en qualité d'examineur.

Cette thèse étant loin d'être un travail solitaire, je tiens à remercier les personnes qui ont contribué de près à ce travail : Madame Céline Boutin, Madame Estelle Léonce et Monsieur Yves Boulard.

Merci Céline pour avoir partagé ton bureau avec moi, pour tes conseils avisés et pour m'avoir apporté ton aide, tes connaissances et tes compétences tout au long de ces 3 années de thèse.

Estelle, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi. Sans ton soutien je ne sais pas comment j'aurai pu aller jusqu'au bout de cette thèse... Je t'exprime ici toute mon amitié et ma reconnaissance.

Yves, j'ai été très contente de « pomper » et de converser avec toi... Merci pour tes conseils, ton soutien et ta compassion à mon égard.

Mes remerciements vont également à Monsieur Gaspard Huber pour avoir toujours répondu présent lorsque je sollicitais son aide.

Viens ensuite Monsieur François-Xavier Legrand alias Peter... que je tiens particulièrement à remercier. Peter, ta générosité, ton aide, ton amitié et ton soutien m'ont portée dans les moments les plus difficiles de cette thèse et ont contribué également aux meilleurs moments de celle-ci. Tu m'as aussi donnée l'occasion de prendre exemple sur un excellent chercheur, je ne sais pas si je te l'ai déjà dit mais Merci François-Xavier.

Je suis consciente de la chance que j'ai eu de travailler dans leur équipe et je les remercie très sincèrement de m'y avoir intégrée pendant ces 3 belles années.

Je tiens aussi à remercier les chercheurs en postdoc et les étudiantes en master que j'ai eu la chance de croiser au cours de ma thèse : Hana Kourilova, Olivier Vilain, Jing Xin et Aude Pavilla. J'ai été très heureuse de vous connaître et de partager ces moments scientifiques et d'amitiés avec vous, je ne vous oublierai pas.

Je remercie Monsieur Bruno Coltrinari, pour ses talents artistiques et de verrerie... dont il a bien voulu nous faire profiter. Bruno, merci pour ta sympathie à mon égard et pour avoir partagé avec nous quelques déjeuners en faisant redescendre la pression qui pèse sur moi dans ces moments-là...

Je remercie aussi Messieurs Christian Chauvin et Louis Liagre de l'atelier de mécanique pour leur précieuse contribution lors de la réalisation du montage de pompage optique.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à Madame Luisa Ciobanu pour les expériences in vivo faites à Neurospin. Je suis très heureuse d'avoir eu la chance de travailler avec elle et je lui suis particulièrement reconnaissante de m'avoir proposée son soutien pour ma recherche de postdoc.

Je souhaiterais aussi adresser toute ma reconnaissance à tous les autres membres du laboratoire pour leur accueil, leur accessibilité, leurs conseils et leur gentillesse à mon égard. Un grand merci à Dimitrios Sakellariou, à Thibault Charpentier (pour le café ..), à Francine Brunet, à Anne Soleilhavoup et à Alan Wong. Merci à Mélanie Moskura et Angelo Guiga pour leur sympathie et les discussions fortes intéressantes et agréables que nous avons pu avoir.

Je voudrais remercier Monsieur Bernard Rousseau et sa crypto team : Naoko Kotéra, Léa Delacour, Ténin Traoré avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour la partie chimique de ma thèse !

Durant ma thèse j'ai également eu la chance de pouvoir faire un monitorat d'enseignement à l'Université de Versailles. Pour cette raison je suis infiniment grée à Monsieur Georges Linares pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe enseignante du département de physique de l'UVSQ. Un grand merci également à Madame Chantal Larpent, Madame Dominique Mitton, Madame Agnès Delage, Monsieur Loïc Fache, et Monsieur Olivier Chimi grâce à qui et avec qui j'ai eu la chance d'enseigner... Le monitorat a été une expérience passionnante et un rêve qui s'est réalisé.

Je remercie également l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines pour le financement de cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour m'avoir soutenue et pour m'avoir supportée pendant toutes ces années.

Table des matières

Chapitre 1 - Introduction	9
Chapitre 2 - Les bases: la RMN, l'IRM et l'imagerie moléculaire	15
2.1. Principes de la RMN et de l'IRM	15
2.1.1. RMN	15
2.1.2. IRM.....	18
2.2. Imagerie moléculaire	30
2.3. Xénon : Propriétés physiques et RMN.....	34
Chapitre 3 - Hyperpolarisation: Un état hors équilibre	41
3.1. Sensibilité et polarisation en RMN	41
3.2. Polarisation Nucléaire Dynamique	43
3.3. Para-hydrogène	46
3.4. Pompage optique.....	49
3.4.1. Méthode de pompage optique par échange de spin.....	49
3.4.2. Réalisation expérimentale	54
3.4.3. Résultats d'hyperpolarisation.....	59
3.5. Pompage optique à partir de diodes lasers	59
3.5.1. Motivation et Principe	59
3.5.2. Réalisation expérimentale	61
3.5.3. Résultats d'hyperpolarisation et discussion.....	70
3.5.4. Modélisation.....	79
Chapitre 4 - Les séquences d'IRM adaptées aux espèces hyperpolarisées	89
4.1. Projection-Reconstruction	90
4.2. FLASH.....	91
4.3. TRUE FISP	93
4.4. Imagerie par Echo Planaire	94
4.5. Imagerie spirale	95
Chapitre 5 – Systèmes hôtes du xénon	101
5.1. Propriétés visées et exemples de systèmes hôtes.....	101

5.1.1. Critères de sélection d'une molécule hôte du xénon	101
5.1.2. Systèmes moléculaires pour l'encapsulation du xénon	103
5.2. Caractérisation des cryptophanes par RMN	108
5.3. Séquences RMN ^{129}Xe spécifiques	119
5.3.1. Excitations sélectives en fréquence	119
5.3.2. HyperCEST	120
5.3.3. Détection directe et HyperCEST en imagerie	121
Chapitre 6 – Biosondes utilisant la RMN du ^{129}Xe	131
6.1. Biosondes de la littérature	131
6.2. Biosonde transferrine	138
Chapitre 7 – Sonde IRM à base de xénon hyperpolarisé pour la détection d'ions métalliques	151
7.1. Objectifs	151
7.2. Description de la sonde	152
7.3. Détection des ions Zn^{2+}	154
7.3.1. Préparation des échantillons	154
7.3.2. Résultats et discussion	154
7.4. Autres cations	167
7.4.1. Vers un 'ionomètre'	168
7.4.2. Ions uranyle	172
7.4.3. Imagerie simultanée et sensible des différents ions	173
7.5. Conclusions et perspectives	176
Chapitre 8 - Résultats <i>in vivo</i>	181
8.1. Les objectifs	181
8.2. Etat de l'art	181
8.2.1. IRM anatomique	182
8.2.2. Etude de la fonction pulmonaire par IRM	185
8.2.3. Mode d'administration du xénon	187
8.3. Nos résultats préliminaires	188
8.3.1. Protocole et Instrumentation	188
8.3.2. Tests sur le mode d'administration du xénon	190
8.3.3. Expériences avec un précurseur de biosonde	193
Chapitre 9 – Conclusion et Perspectives	201

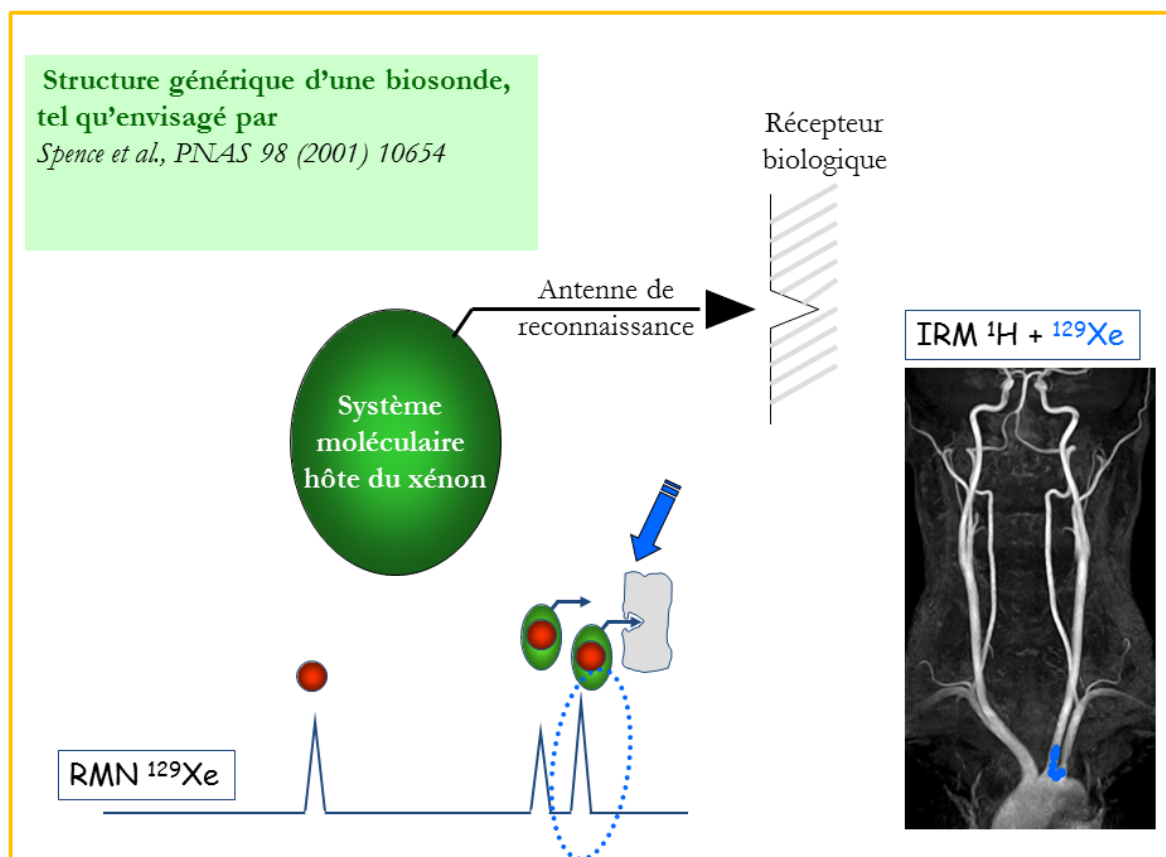
Chapitre 1

Introduction

Chapitre 1 - Introduction

Depuis longtemps, l'IRM fait partie intégrante des techniques de diagnostic médical en complément des autres modalités d'imagerie, mais ce n'est que depuis la toute fin du XX^{ème} siècle avec l'arrivée des espèces hyperpolarisées qu'un nouvel essor est apparu, laissant envisager des applications beaucoup plus demandeuses en terme de sensibilité. Parmi les entités dont on peut augmenter la polarisation nucléaire et donc le signal RMN de plusieurs ordres de grandeur, le xénon se distingue par sa capacité à interagir avec son environnement proche, ce qui se traduit par une large gamme de déplacement chimique.

En particulier, l'équipe d'Alexander Pines à Berkeley a proposé en 2001 une nouvelle approche permettant d'utiliser le xénon hyperpolarisé pour détecter des cibles biologiques.



Puisque le xénon n'a pas d'affinité particulière pour des sites biologiques donnés, mais qu'il s'encapsule facilement dans de nombreux systèmes moléculaires, l'idée est de le transporter jusqu'aux sites biologiques d'intérêt par l'intermédiaire de molécules hôtes qui seront fonctionnalisées en fonction de la cible visée. Le xénon encapsulé possédant une signature spectrale différente du xénon libre, cette approche devrait conduire à une imagerie ultra sensible et ultra spécifique. Ce domaine de recherche constitue le cadre de ce mémoire.

Cette thèse débute par la description des principes de base de la technique que nous utilisons : la RMN. L'IRM, fille de la RMN, est aussi présentée. Puis nous aborderons les thèmes principaux qui nous intéressent : l'imagerie moléculaire et le xénon 129. Tout ceci constitue le chapitre 2.

Le chapitre 3 décrit les principes théoriques et les montages développés au laboratoire dans le but de produire du xénon 129 hyperpolarisé. Le montage de pompage optique à base de laser est le dispositif historique conçu par Patrick Berthault et Hervé Desvaux lors de la formation de l'unité de recherche sur la thématique de la RMN du xénon hyperpolarisé. Ce premier montage permet de produire de petites quantités de gaz avec une très forte polarisation. Le deuxième montage, à base de diodes lasers, est celui que j'ai particulièrement développé au cours de ma thèse. Il permet de polariser plus rapidement de plus grandes quantités de xénon avec toutefois de plus faibles taux de polarisation.

Etant donné le caractère éphémère de l'aimantation obtenue après pompage optique, les séquences d'IRM utilisées pour les espèces hyperpolarisées ont leurs propres caractéristiques, très différentes de celles des séquences habituelles. Le chapitre 4 présente un état de l'art bibliographique de ces séquences.

Le chapitre 5 traite des questions relatives aux systèmes hôtes du xénon. Après une introduction sur les propriétés propices à l'encapsulation du xénon, ce chapitre fait part des travaux réalisés sur l'étude et la caractérisation de cryptophanes qui sont les molécules-cages choisies pour cette thèse.

Le chapitre 6 débute par une étude bibliographique des principales biosondes de xénon existantes ; la seconde partie de ce chapitre présente les résultats obtenus au

laboratoire sur une biosonde des récepteurs de la transferrine où pour la première fois, il a été possible de détecter des événements biologiques extra- et intra-cellulaires sur cellules vivantes.

Le chapitre 7 décrit le développement d'une biosonde IRM de xénon 129 spécifique à la détection d'ions métalliques. Nos résultats sur la détection des ions zinc y sont présentés. Sont également développés nos résultats sur des métaux toxiques tels que le plomb et le cadmium.

Le chapitre 8 enfin, traite de la problématique du passage à l'*in vivo*, des avancées qui existent dans le domaine de l'imagerie pulmonaire ainsi que des premiers résultats que nous avons obtenus sur un modèle petit animal.

Chapitre 2

Les bases: la RMN, l'IRM
et l'imagerie moléculaire

Chapitre 2 - Les bases: la RMN, l'IRM et l'imagerie moléculaire

2.1. Principes de la RMN et de l'IRM

2.1.1. RMN

Une expérience de résonance magnétique nucléaire ou RMN consiste à placer un échantillon dans un champ magnétique statique dans lequel les moments magnétiques de spin s'orientent en prenant des énergies quantifiées. Un champ oscillant perturbe les populations des différents niveaux d'énergie, et on détecte une force électromotrice traduisant la réponse du système. A ce stade il est intéressant de rappeler l'histoire de cette spectroscopie¹ :

« La RMN fut découverte dans la matière condensée à la fin de 1945 par deux équipes américaines : Purcell, Torrey et Pound à Harvard ; et Bloch, Hansen et Packard à Stanford. (...) Son observation presque simultanée par les deux groupes souleva immédiatement un problème d'incompréhension mutuelle. Le groupe de Purcell considérait l'absorption résonnante d'énergie due à la transition entre niveaux quantifiés d'énergie Zeeman des noyaux, dans la ligne de pensée de la spectroscopie atomique, surtout développée depuis le début du siècle. Le groupe de Bloch parlait de la composante tournante de l'aimantation nucléaire macroscopique, et de la f.é.m. (force électromotrice) qu'elle induisait dans une bobine. Pendant quelques mois, ils pensaient avoir découvert des phénomènes différents. L'origine de cette incompréhension provenait d'un aspect totalement inhabituel de cette nouvelle spectroscopie : elle utilisait une excitation cohérente, en l'espèce d'un champ de radiofréquence d'amplitude finie, au contraire de la spectroscopie optique dont les sources d'excitation étaient incohérentes. »

Il est bien connu que les moments magnétiques nucléaires précessent autour de l'axe du champ statique B_0 à la fréquence de Larmor $\nu_0 = \gamma B_0$ où γ est le rapport gyromagnétique en Hz.T^{-1} qui traduit la sensibilité d'un isotope au champ magnétique. Un ordre d'idée : les noyaux d'hydrogène précessent à une fréquence de 42.58 MHz dans un champ de 1 Tesla. Le côté cohérent de cette spectroscopie apparaît lorsque l'on applique un champ modulé à la fréquence de Larmor (donc radiofréquence) pendant un temps bref. L'aimantation globale - somme de tous les moments magnétiques nucléaires - initialement alignée avec le champ statique (axe z), est basculée selon un axe bien défini dans le plan transversal xy. La composante xy du signal de précession libre est détectée au moyen de l'induction que les moments magnétiques créent dans une bobine (μV). L'aimantation revient progressivement à l'équilibre par les phénomènes de relaxation ; on détecte donc une sinusoïde amortie par type de noyau. Après transformation de Fourier, on obtient un spectre dans le domaine des fréquences.

Pour comprendre les découvertes qui ont conduit au développement de cette spectroscopie, reprenons l'histoire. Au départ objet de curiosité pour les physiciens, on s'est très vite rendu compte que la RMN était un outil puissant pour étudier la matière condensée. En effet, plus que la fréquence de résonance elle-même, ce sont les perturbations apportées à la résonance par des interactions avec l'environnement local qui représentent l'objet principal d'investigation.

Outre l'effet Zeeman qui est l'interaction des moments magnétiques nucléaires avec le champ magnétique, des termes énergétiques représentant les différentes interactions interviennent : le déplacement chimique, les interactions directes et indirectes, le couplage quadrupolaire pour les spins supérieurs à $\frac{1}{2}$, etc.

A ce stade il convient de prendre en compte un paramètre fondamental qui est la présence de mouvements moléculaires plus ou moins importants. Toutes les interactions précédemment nommées sont par nature anisotropes, c'est-à-dire que leur forme et leur intensité dépendent de l'orientation des vecteurs moments magnétiques dans l'espace. En l'absence de mouvement, ces interactions se traduisent par des effets en fréquence, directement observables sur le spectre. En RMN du liquide qui est le domaine d'étude de la thèse, le mouvement des molécules moyenne les parties anisotropes des interactions.

Seules les valeurs moyennes de certaines interactions sont conservées (déplacement chimique, couplage indirect), alors que pour d'autres c'est la perturbation au second ordre qui intervient pour modifier la vitesse de retour à l'équilibre de l'aimantation (relaxation dipôle-dipôle, relaxation quadrupolaire, etc..). La relaxation provient des mouvements de translation, rotation etc. de toutes les particules au voisinage du noyau considéré, qui créent des champs magnétiques fluctuants dont la moyenne est nulle mais dont la somme des carrés n'est pas nulle. Dès que ces champs fluctuent à une fréquence correspondant à la fréquence d'une interaction RMN, il y a un effet microscopique correspondant à une impulsion locale. Il n'y a aucune information spatiale entre ces différentes transitions au sein de l'échantillon, la relaxation est un phénomène incohérent. Si l'aimantation est selon z, seules les composantes des fluctuations en x et y de ces mouvements vont intervenir pour la relaxation (relaxation longitudinale caractérisée par le temps T_1), si elle est selon un axe du plan transversal (x par exemple), seules les composantes des fluctuations en y et en z vont intervenir (relaxation transversale caractérisée par le temps T_2^*). Cette dernière composante contenant les inhomogénéités du champ magnétique (sans effet sur la relaxation T_1), on comprend aisément que T_2^* est toujours plus petit que T_1 . Les champs locaux étant différents de spin en spin, une perte progressive de la cohérence des vecteurs aimantation dans le plan transversal intervient pour contribuer au T_2^* .²

Le déplacement chimique représente une modification du champ magnétique dans lequel se trouve le noyau en fonction de la densité électronique qui l'entoure, et donc est dépendant de la nature chimique du groupement auquel il appartient. Nous verrons par la suite qu'il revêt une importance énorme dans le cas du xénon.

Le couplage indirect (ou scalaire) ne revêt pas la même importance pour le xénon hyperpolarisé, mais c'est lui qui permet les transferts d'aimantation entre noyaux séparés par quelques liaisons, ce qui est vital pour les expériences impliquant le para-hydrogène (voir plus loin).

Si l'on excepte les spins supérieurs à $\frac{1}{2}$ pour lesquels la relaxation quadrupolaire est prépondérante la plupart du temps, le mécanisme de relaxation important est la relaxation dipolaire, qui peut apparaître entre deux noyaux de la même molécule ou de molécules

différentes. Le transfert d'information (de polarisation) par voie dipolaire implique des interactions locales entre les noyaux considérés. La vitesse de relaxation croisée dépend à la fois de la distance entre les deux particules à la puissance -6 ($1/r^6$) et de la dynamique de la paire de spins considérée, mais aussi du produit des carrés des rapports gyromagnétiques. C'est donc une interaction très locale qui permettra un transfert de polarisation (sans qu'il y ait nécessité de liaison chimique) entre deux noyaux typiquement séparés par moins de 5 Å.

Cette distance est largement augmentée dans le cadre d'une interaction électron-noyau au regard du rapport gyromagnétique de l'électron ($\gamma_e \sim 700 \gamma_H$). La relaxation induite deviendra dramatique dans le cas de la présence d'électrons célibataires (cas de l'oxygène dissous).

2.1.2. IRM

En 1973, Paul Lauterbur invente l'IRM, initialement dénommée zeugmatographie. Dans son article de Nature,³ il mentionne : « La formation d'une image requiert habituellement que l'objet interagisse avec un champ de radiation caractérisé par une longueur d'onde plus petite que les plus petits détails à distinguer, de manière à ce que la région d'interaction soit restreinte et une image résolue générée ». Cependant, la longueur d'onde utilisée en RMN est de l'ordre du mètre, il met donc en évidence qu'il est impossible d'utiliser ce principe en RMN pour discriminer les signaux provenant de différents éléments de volume à l'échelle du millimètre ou du micromètre comme le requiert l'imagerie médicale. De cette limitation il propose un nouveau type d'imagerie. L'idée est de faire intervenir un second champ qui restreindrait l'interaction de l'objet avec le premier champ. En appliquant un gradient du champ magnétique statique (de l'ordre de la dizaine à la centaine de mT/m) dans une direction on parvient à faire varier la fréquence de résonance spatialement d'après la relation de Larmor. La position de chaque élément est ainsi codée en fonction de la fréquence de précession et/ou du décalage de phase induit.

2.1.2.1. Formation d'une image en 1D

Partons d'abord de la séquence d'impulsion la plus simple permettant l'obtention d'une image 1D (Figure 2-1). Celle-ci est constituée d'une impulsion d'excitation de 90° pour basculer l'aimantation dans le plan traverse et d'un gradient de champ magnétique appliqué pendant l'acquisition du FID. Le gradient utilisé représente la variation de champ magnétique en fonction de la coordonnée spatiale qui se superpose au champ magnétique principal B_0 . On l'exprimera en gauss/cm ou en T/m.

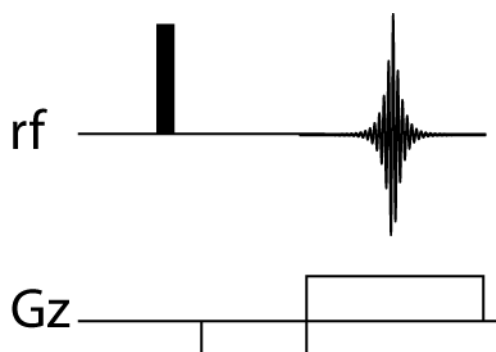


Figure 2-1 : Séquence d'IRM permettant l'obtention d'une image 1D.

Après transformation de Fourier, on obtient le profil spectral de l'objet étudié. Prenons l'exemple en figure 2-2 d'une bouteille d'eau observée en IRM ^1H .

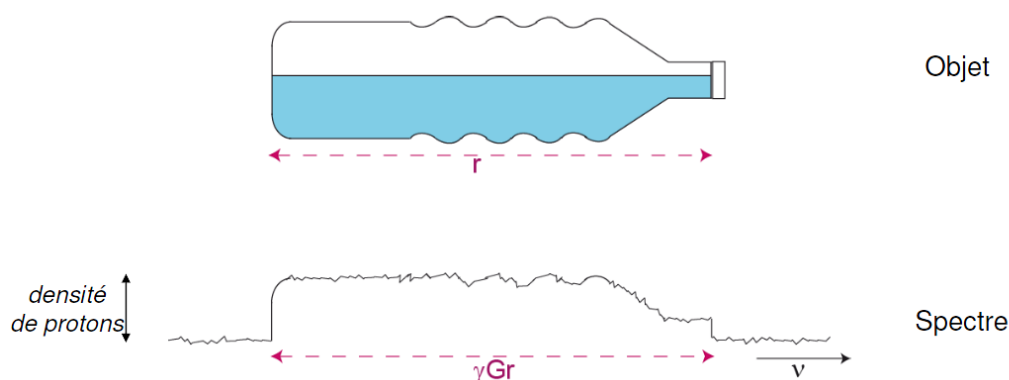


Figure 2-2 : Profil spectral de l'objet bouteille.

En un point donné r_i de l'échantillon, le champ magnétique est $B(r_i) = \gamma(B_0 + G \cdot r_i)$. D'après la relation de Larmor, l'élargissement en fréquence dû à la dimension de l'objet est donc donné par $\Delta\nu = \gamma G r$, où γ est le rapport gyromagnétique du noyau observé et r est la dimension de l'objet dans la direction du gradient.

L'amplitude du gradient joue donc sur la largeur et la hauteur du profil spectral (l'intégrale du signal restant évidemment la même). En l'absence de gradient ($G=0$), la largeur du pic est proportionnelle à $1/\pi T_2^*$, et donc en particulier dépend de l'homogénéité du champ statique. En présence d'un gradient, le pic s'élargit en fonction du profil spatial de l'objet. Si l'amplitude du gradient est multipliée par n , l'élargissement spectral de l'objet est n fois plus étendu (Figure 2-3).

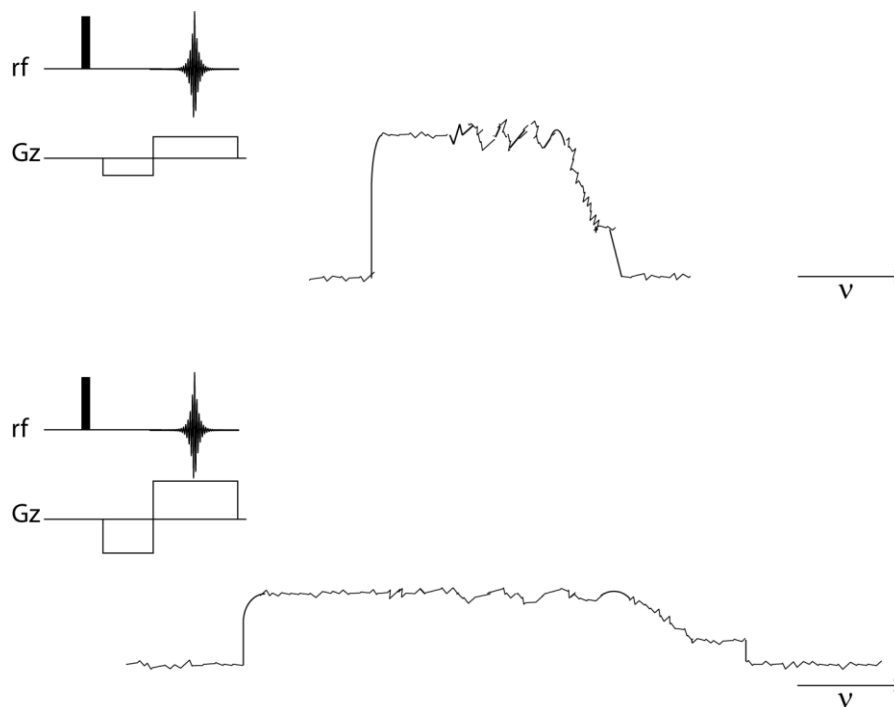


Figure 2-3 : Effet de l'intensité du gradient sur le profil spectral.

2.1.2.2. Transformation de Fourier

Pour obtenir l'image spatiale de l'objet, on utilise la transformation de Fourier qui est une opération mathématique permettant de passer du domaine des temps au domaine des fréquences. Le plan de Fourier est constitué des données brutes acquises lors de l'expérience. Celles-ci sont stockées dans un tableau appelé «espace des k» (ou « espace réciproque »). Dans cette matrice le vecteur d'onde k , d'unité le m^{-1} , est défini comme suit :

$$\vec{k} = \gamma \vec{G} t$$

La transformation de Fourier permet donc le passage entre le domaine de l'espace des k et le domaine spatial de l'image, appelé espace réel.

$$F(r) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(k) e^{-i2\pi k r} dk$$

La figure 2-4 présente l'espace réciproque et l'espace réel de l'image d'un cerveau obtenu par la transformation de Fourier.

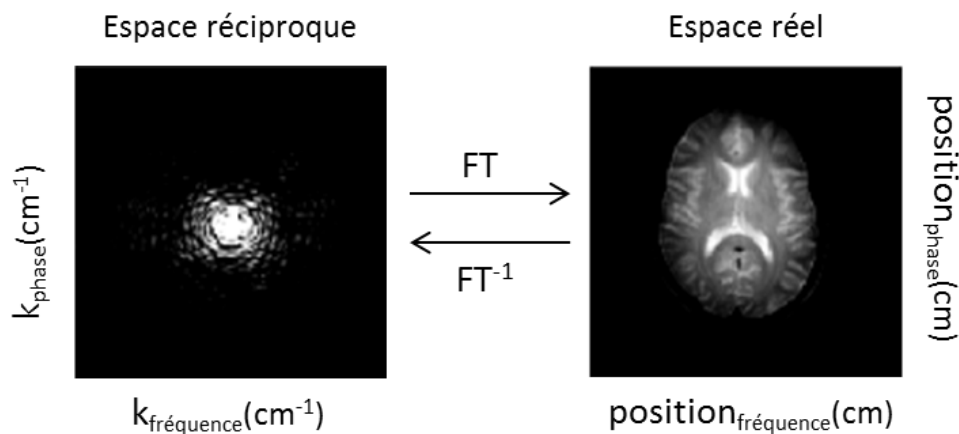


Figure 2-4 : Espace réciproque (à gauche) et espace réel (à droite) de l'image d'un cerveau.⁴ La partie blanche représente un signal plus intense.

Il existe différentes façons de parcourir l'espace des k . Le mode de remplissage le plus simple est le mode cartésien. Une ligne peut être balayée en entier à chaque répétition

de la séquence, ou point par point (1 acquisition pour 1 point), ou encore l'espace entier peut être balayé en une seule fois (EPI, voir plus loin). Il existe d'autres méthodes pour couvrir l'espace des k .

2.1.2.3. Séquences de base utilisées en IRM

Lorsque l'on utilise un gradient pendant l'acquisition pour faire l'image dans la dimension directe ('encodage de fréquence'), la durée de vie du signal est très courte et il est souvent nécessaire de réaliser un écho pour pouvoir acquérir les points pendant que l'aimantation est dans le plan transversal. La plupart des séquences d'IRM utilisent donc des séquences d'écho de gradient ou de spin.

Dans le cas d'un écho de gradient sur un système modèle composé de 2 tubes d'eau et de graisse séparés d'une distance $2r$ (Figure 2-5A), à la fin de l'application du 1^{er} gradient, chaque spin aura acquis une phase proportionnelle à sa coordonnée spatiale (et au déplacement chimique). A la fin du second gradient d'amplitude égale mais de signe opposé, les vecteurs aimantations sont refocalisés (mais pas le déplacement chimique ni les inhomogénéités de champ magnétique, Figure 2-5B).

Il est possible d'obtenir de plus la refocalisation (l'annulation) des effets de déplacement chimique (et de susceptibilité magnétique) avec des gradients de même signe et de même amplitude en utilisant un écho de Hahn (Figure 2-5C).⁵

Outre TE, le temps d'écho dans une séquence d'imagerie, un autre temps caractéristique à prendre en compte est TR, le Temps de Répétition. Il correspond non seulement au délai entre deux impulsions radiofréquences mais surtout au temps de récupération de l'aimantation longitudinale M_z . Il est dans ce type de séquence (d'écho de gradient ou de spin) choisi en fonction du contraste voulu.

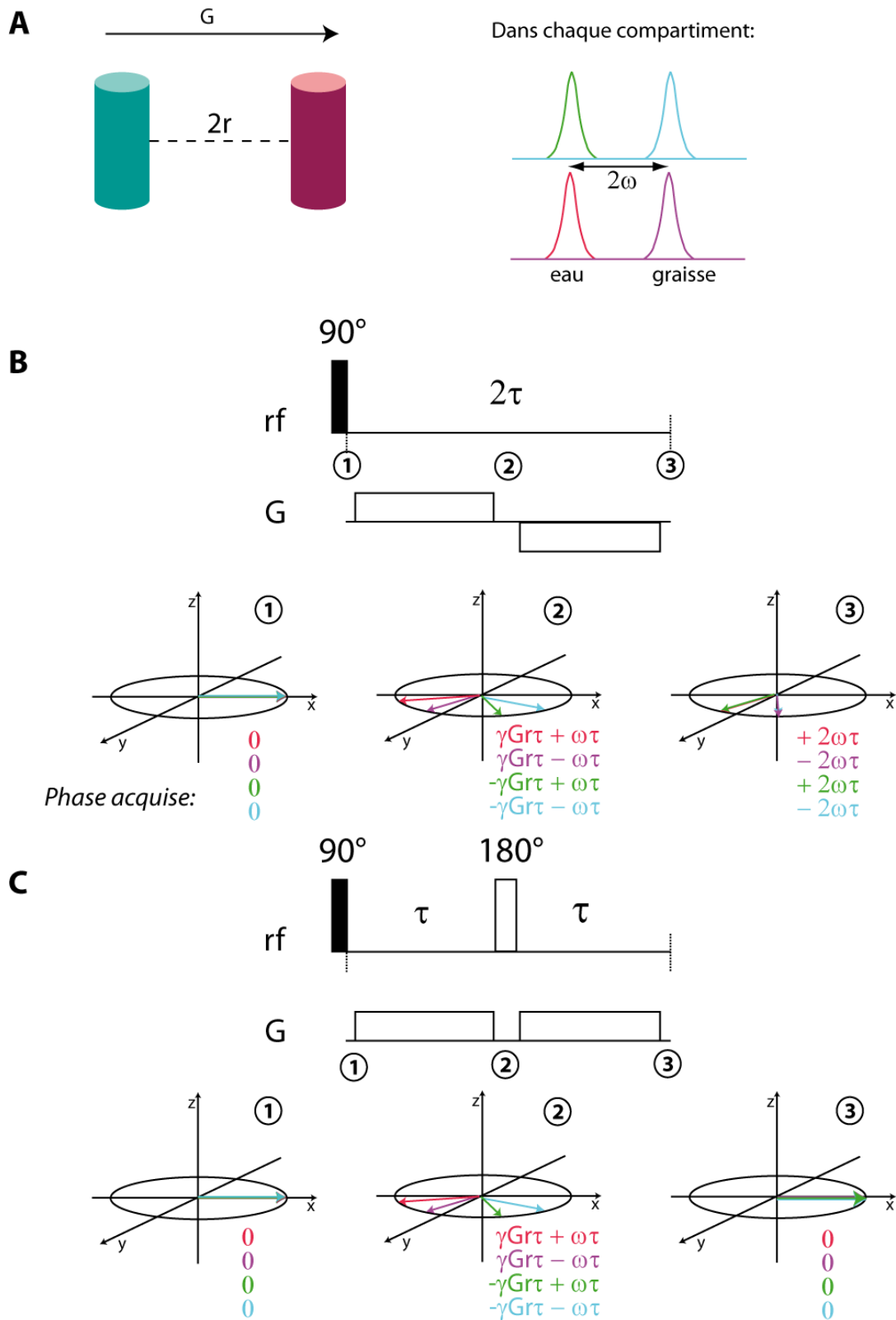


Figure 2-5 : A) Système modèle utilisé pour décrire les séquences d'écho de gradient et d'écho de spin : deux cylindres séparés d'une distance r selon l'axe du gradient, l'un contenant de l'eau, l'autre de la graisse ; B) Evolution des spins lors d'un écho de gradient ;C) Evolution des spins lors d'un écho de spin.

Classiquement, une image de résonance magnétique peut être créée par une séquence qui se décompose en trois parties : sélection de tranche, encodage de phase et encodage de fréquence. Toutes les séquences n'utilisent pas ce principe, certaines par exemple peuvent contenir 2 encodages de phase et pas d'encodage de fréquence.

La sélection de tranche consiste à appliquer une impulsion radiofréquence sélective en fréquence en présence d'un gradient de champ magnétique. Ainsi on sélectionne une coupe dans une direction choisie en fonction de la direction du gradient (Figure 2-6).

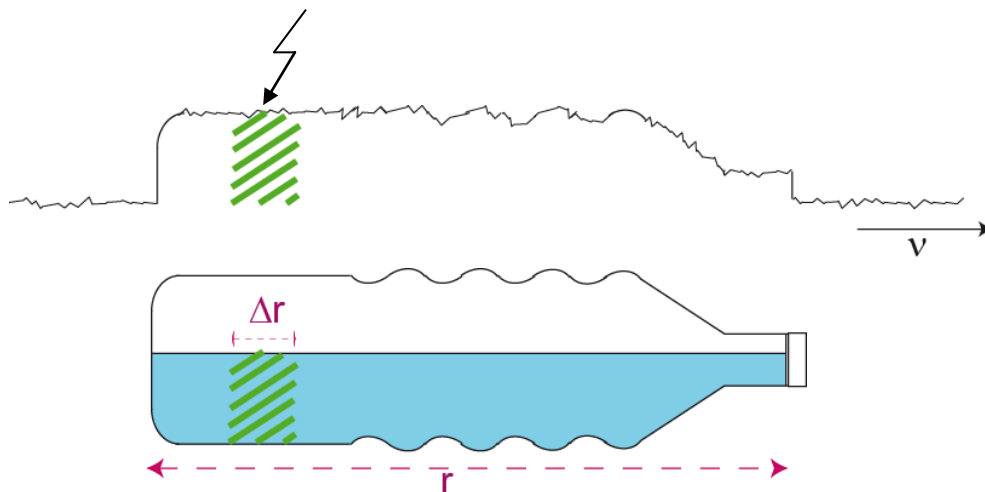


Figure 2-6 : Sélection de tranche Δr obtenue par une impulsion sélective de largeur d'excitation $\Delta \nu$ en présence de gradient G , tel que $\Delta \nu = \gamma G \Delta r$.

La région spectrale excitée est déterminée par la fréquence de l'impulsion sélective. L'épaisseur de la tranche sélectionnée est déterminée par deux paramètres :

- La durée de l'impulsion: pour une forme d'impulsion donnée, plus cette durée est longue, plus la gamme de fréquence est étroite, donc plus la tranche sélectionnée est fine.
- L'intensité du gradient : plus le gradient appliqué est fort et plus la tranche est fine.

La partie de la séquence d'IRM permettant d'obtenir la seconde dimension de l'image, qui correspondrait à la dimension indirecte en spectroscopie, est le codage par la phase. Le codage de phase consiste à appliquer un gradient en l'absence de toute impulsion ou d'acquisition dans le but de déphaser l'aimantation en fonction des coordonnées spatiales. La deuxième dimension est créée par l'acquisition de plusieurs expériences à différentes valeurs de gradient. Ce gradient est incrémenté autant de fois que de points sont nécessaires pour coder cette dimension.

Enfin, l'encodage de fréquence est caractérisé par l'application d'un gradient de lecture pendant l'acquisition. Il permet le codage de la dimension directe.

Le schéma typique d'une expérience d'écho de gradient est donc au final celui de la Figure 2-7.

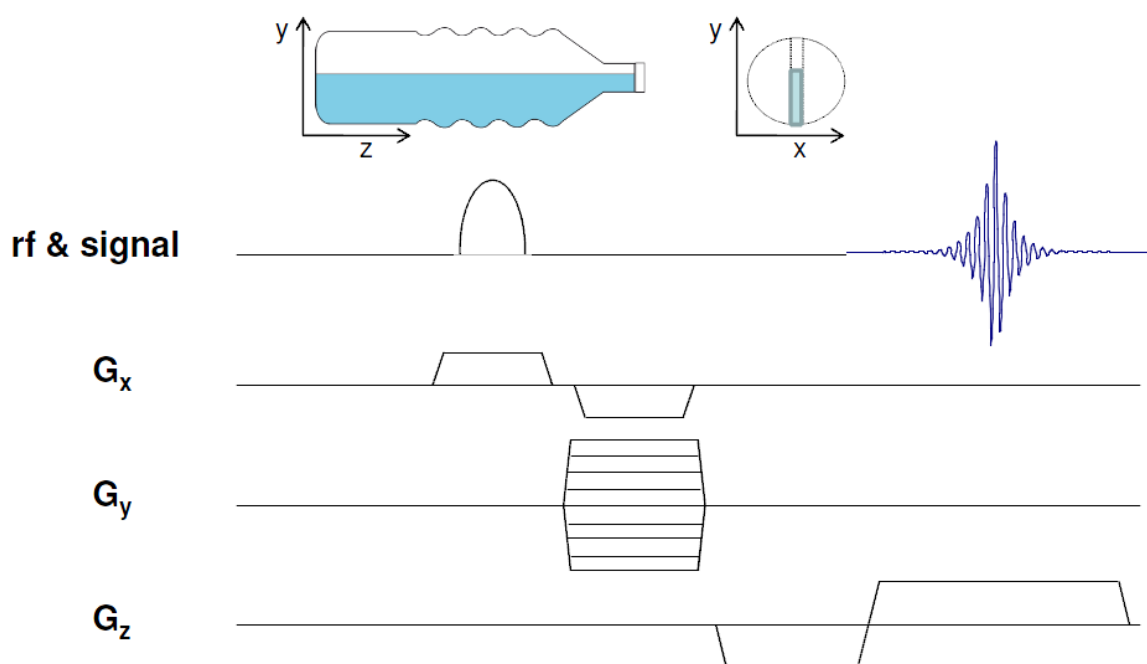


Figure 2-7 : Schéma typique d'une expérience d'IRM basée sur un écho de gradient.

Dans cette séquence, puisque le gradient de lecture G_z est appliqué pendant le temps d'acquisition, une ligne entière de l'espace des k est couverte en une acquisition. Si dans la

dimension de phase on a N_y points (incréments de gradient), et que l'on a un temps de récupération TR , la durée totale d'acquisition pour 1 scan sera : $TA = N_y * TR$.

Il existe des séquences n'utilisant pas de gradient pendant l'acquisition. Pour se déplacer dans l'espace des k selon z , on aura un encodage de phase supplémentaire selon cet axe. Le temps d'acquisition sera beaucoup plus long, puisqu'il faudra $TA = N_y * N_z * TR$ pour couvrir la totalité de l'espace des k (les points seront acquis un à un au lieu de ligne à ligne). De telles séquences seront utilisées lorsque $1/T_2$ est extrêmement court. Dans ce cas, on ne gardera que le premier point du FID, séquence SPI ('Single Point Imaging'), 2/ lorsque l'on souhaite garder l'information de nature chimique (différentiation de métabolites, etc.) Séquences d'imagerie spectroscopique.

L'acquisition du signal s'effectue avec une fréquence d'échantillonnage donnée par le théorème de Nyquist. Un signal pour lequel le théorème n'est pas respecté donnera un artéfact dans le domaine des fréquences. Selon ce théorème : $DW = 1/SW$, avec DW le temps entre deux points acquis et SW la largeur spectrale (en Hz). Dans une séquence avec encodage de fréquence, dans la dimension directe cette relation intervient également dans la définition du champ de vue.

Le champ de vue, généralement noté FOV (en raison de son appellation anglo-saxonne : Field Of View), est défini comme la taille de la zone à imager, souvent plus grand que la taille de l'objet r . Si l'on repart de l'équation $\Delta v = \gamma Gr$, il est aisé de comprendre que dans la dimension de lecture, le champ de vue est décrit par la relation suivante :

$$FOV_z = \frac{1}{\gamma \cdot G_z \cdot DW} = \frac{1}{\Delta k_z}$$

Dans la dimension de phase le FOV s'écrit :

$$FOV_y = \frac{1}{\gamma \cdot \Delta G_y \cdot t} = \frac{1}{\Delta k_y}$$

où ΔG_y est l'incrément d'amplitude de gradient de phase et t est le temps pendant lequel celui-ci est appliqué.

Ces égalités nous montrent que le FOV est également donné par l'écartement des lignes de l'espace des k (Δk). On en déduit donc que plus les lignes dans l'espace des k sont éloignées, plus le champ de vue est petit (Figure 2-8).

Un autre paramètre important est la résolution spatiale. Celle-ci est définie par le nombre de points par unité de longueur (Figure 2-8). Elle est fixée par les équations suivantes :

$$\frac{1}{\Delta z} = \frac{N_z}{FOV_z} = k_z$$

$$\frac{1}{\Delta y} = \frac{N_y}{FOV_y} = k_y$$

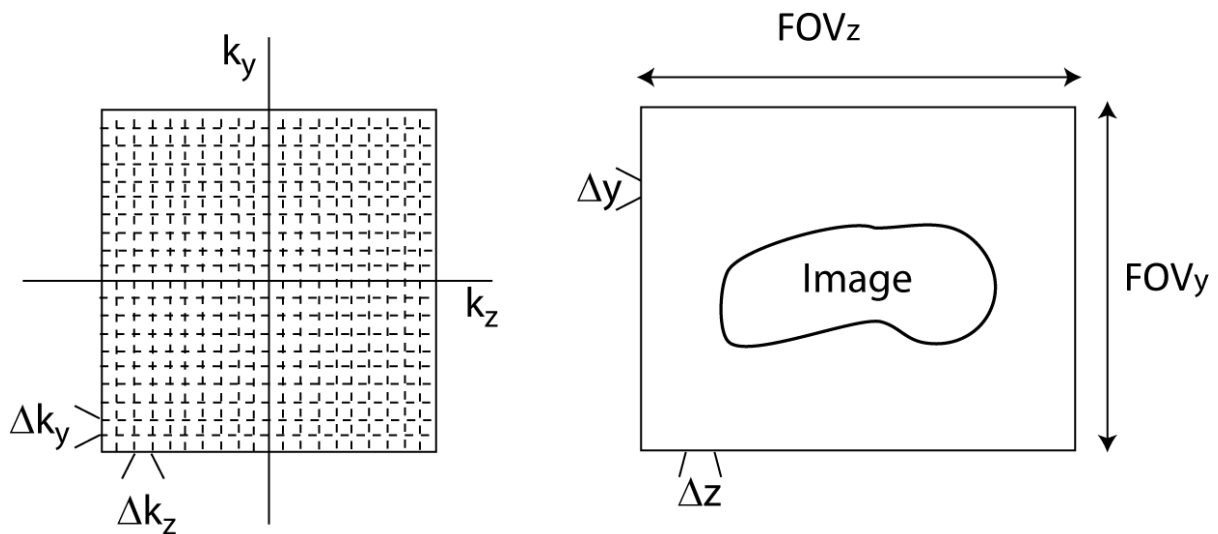


Figure 2-8 : Schéma de définition du FOV et de la résolution spatiale de l'image.

La résolution spatiale dépend donc du rapport gyromagnétique, de l'amplitude maximale du gradient et de son temps d'application.

La majeure partie de l'information de l'image se trouve au centre de l'espace des k (basses fréquences, Figure 2-9A). Ces basses fréquences caractérisées par l'intensité la plus élevée, donnent la forme générale de l'image. Les hautes fréquences sont, elles, à l'origine de la résolution spatiale. La transformation des valeurs en bordure du plan de Fourier (hautes fréquences) donne les détails et la netteté du contour de l'image (Figure 2-9B).

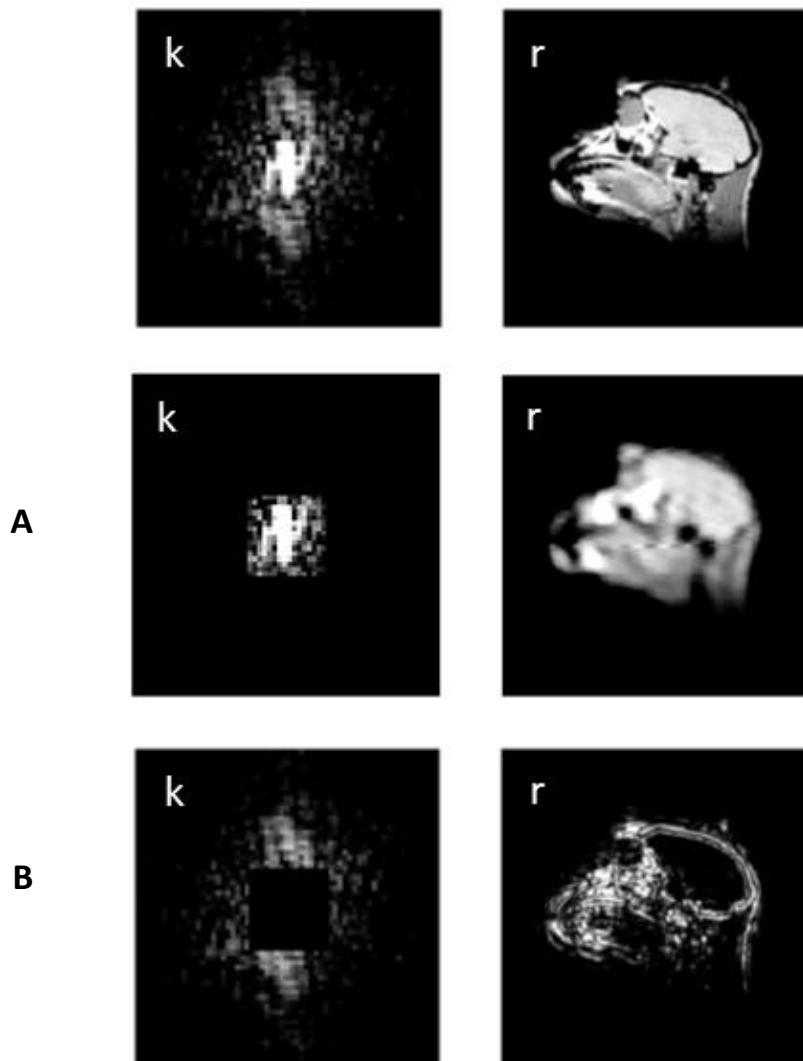
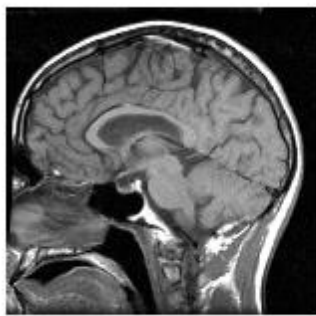


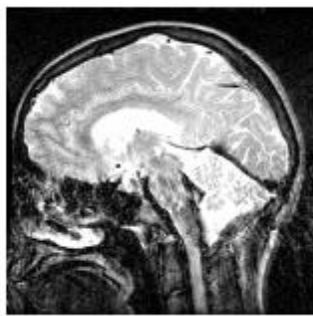
Figure 2-9 : Espace des k à gauche, et espace réel (image) d'une tête de singe à droite. En haut, utilisation de tous les points de l'espace des k pour la Transformation de Fourier ; au milieu en **A**, seuls les points à basse fréquence sont conservés ; en bas en **B**, seuls les points à haute fréquence sont conservés. Tiré de 'In vivo NMR spectroscopy : principles and techniques', 2nd edition, de Robin A. de Graaf, Ed. wiley (2007).

2.1.2.4. Contraste de l'image

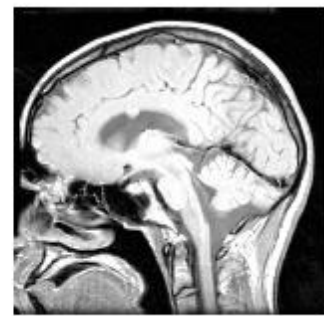
Il existe trois principaux types de contraste : le contraste en T_1 , le contraste en T_2 (ou T_2^*) et le contraste de densité de noyaux. On peut établir un contraste spécifique en modifiant les temps de répétition et d'écho qui feront apparaître les différences de temps de relaxation des différents noyaux étudiés. Un temps de répétition (TR) et un temps d'écho (TE) courts donneront un contraste d'image pondéré en T_1 (contraste positif : les noyaux dont l'aimantation revient la plus vite sur z est la plus disponible pour la séquence suivante) tandis qu'un TE et TR longs pondéreront l'image en T_2 (contraste négatif : les noyaux dont l'aimantation relaxe le plus rapidement en T_2 vont donner moins de signal). Un temps de répétition long et un temps d'écho court donnera lui accès à un contraste de densité (Figure 2-10).



Contraste T_1
 $T_E = 14 \text{ ms}$
 $T_R = 400 \text{ ms}$



Contraste T_2
 $T_E = 100 \text{ ms}$
 $T_R = 1500 \text{ ms}$



Densité ^1H
 $T_E = 14 \text{ ms}$
 $T_R = 1500 \text{ ms}$

Figure 2-10 : Différents contrastes d'images de cerveau.⁶

2.2. Imagerie moléculaire

Le concept d'imagerie moléculaire est né au début du XXI^{ème} siècle. Elle vise la compréhension à l'échelle cellulaire ou sub-cellulaire des phénomènes liés au métabolisme normal ou à une pathologie, et vient la plupart du temps en complément de l'imagerie anatomique. A la différence de cette dernière, elle s'intéresse à essayer de sonder les phénomènes moléculaires à l'origine de pathologies et pas seulement leur conséquence. Réalisée *in vivo* au préalable sur petit animal, elle est la plupart du temps définie comme l'imagerie 'non invasive', quantitative et répétitive de récepteurs biologiques au moyen de biomarqueurs ou biosondes.

Ainsi, idéalement, le médecin devrait pouvoir non seulement localiser la pathologie, mais aussi évaluer l'activité des processus au sein de cette pathologie, et fournir des informations pour adapter le traitement.

L'imagerie moléculaire requiert donc deux éléments de base : 1) des sondes moléculaires dont la concentration et/ou les propriétés spectrales sont altérées par le processus biologique d'intérêt, 2) des moyens sensibles pour suivre ces sondes.

C'est là que le bât a longtemps blessé pour la résonance magnétique. Etre capable de détecter et localiser *in vivo* de manière précoce une pathologie ou les effets d'un médicament est au cœur de nombreux efforts de recherche et de développements. La table 2-1 résume les performances des principales modalités d'imagerie, en terme de capacité à imager en profondeur, de résolution spatiale, d'utilisation de rayonnements ionisants ou non, et de sensibilité. Si pour les premiers points, la RMN est très bien placée, elle manque sérieusement de sensibilité.

Technique	Pénétration	Résolution	Ionisation	Sensibilité
Optique	+	> 1 mm	-	nM
Ultrason	++	> 0.4 mm	-	μM
TEP	+++	> 5 mm	++	nM
TEMP	+++	> 4 mm	++	μM
IRM	+++	> 0.04 mm	-	mM

Table 2-1 : Performances des principales modalités d'imagerie, en terme de capacité à imager en profondeur, de résolution spatiale, d'utilisation de rayonnements ionisants ou non, et de sensibilité. Tiré de Hakumäki et al.⁷

Chaque technique d'imagerie a ses propres avantages et inconvénients, mais la plupart des travaux concernent actuellement l'imagerie optique des tissus vivants. L'utilisation de sondes fluorescentes endogènes (GFP, luciférase...) peut permettre par exemple le suivi d'une expression génique,⁸ mais requiert des échantillons d'épaisseur inférieure à 1-2 mm, et donc ne peut pas être réalisée *in vivo*. La pénétration de la lumière peut être augmentée si la longueur d'onde se rapproche du proche infra-rouge (700-1200 nm), à travers par exemple l'utilisation de nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (quantum dots ou Qdots)^{9,10}, mais reste limitée à de faibles profondeurs de tissu. Une profondeur plus élevée (< 10 cm) peut être atteinte en utilisant des mesures de migration de photon dans le domaine fréquentiel (FDPM)^{11,12}, mais au prix d'une moins bonne résolution spatiale.

L'imagerie ultra-son, basée sur l'utilisation d'ondes acoustiques dans la gamme de fréquence 1-70 MHz, constitue une autre technique prometteuse, avec une profondeur de pénétration plus élevée que les techniques optiques.¹³ Cependant, l'imagerie haute résolution (~40 µm) est uniquement applicable aux études sur petit animal à cause de la profondeur de pénétration des ondes haute fréquence encore trop faible.

Les techniques d'imagerie nucléaire, telles la tomographie à émission de positron (TEP) ou la tomographie d'émission mono-photonique (TEMP) sont maintenant largement utilisées, principalement pour l'étude de tumeurs (résolution d'environ 10 mm³). Mais les radio-ligands requis sont chers, ils demandent la proximité d'un cyclotron, et leur courte durée de vie interdit le suivi à long terme de pathologies.

L'IRM pourrait donc constituer une alternative, ou plutôt un complément intéressant. Mais les faibles énergies mises en jeu, permettant une analyse détaillée non destructive, impliquent aussi de très faibles différences de population des niveaux énergétiques à l'équilibre de Boltzmann et donc un très faible signal. Cependant, des biosondes IRM basées sur des agents de contraste de relaxation tels les chélates de gadolinium ont été utilisés pour par exemple imager une expression de gène *in vivo*.¹⁴ La faible sensibilité de l'IRM requiert de hautes doses d'agent de contraste, et donc la toxicité doit être soigneusement évaluée.

Le suivi des 9 protons équivalents des groupes triméthylamine de la choline a été employé pour détecter les membranes altérées, un marqueur pour tous types de cancers. D'autres noyaux tels que ^{31}P , ^{13}C ou ^{19}F peuvent être détectés, mais ces techniques sont limitées aux applications spectroscopiques à cause de la faible sensibilité. Des particules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO) ont été développées et ont conduit à de nouveaux agents de contraste à plus haute sensibilité.¹⁵ Le fait que les SPIO fonctionnalisés avec des ligands produisent un contraste 'négatif', c'est-à-dire avec une réduction de signal, rend les images plus difficiles à interpréter, spécialement pour les tissus hétérogènes tels les tumeurs.

Une classe plus récente de biosondes pouvant permettre de réaliser de l'imagerie moléculaire est l'IRM utilisant des substances endogènes hyperpolarisées.¹⁶ Malgré le temps relativement long de préparation de l'espèce hyperpolarisée par DNP (30 à 90 minutes), les principaux développements ont concerné l'étude des changements métaboliques lors de certains cancers. Plusieurs propriétés doivent être prises en compte : le T_1 doit être suffisamment long pour qu'une fraction importante de l'état d'hyperpolarisation soit préservée *in vivo* ; le processus métabolique doit être suffisamment rapide pour que, étant donné le T_1 de la molécule polarisée, une information utile puisse être obtenue. Si l'on suit le métabolisme d'une substance, le substrat doit donc être transporté rapidement dans le flux sanguin, rapidement internalisé par les cellules et rapidement métabolisé. Ceci s'est révélé réalisable en injectant du pyruvate [$1\text{-}^{13}\text{C}$] qui produit du lactate [$1\text{-}^{13}\text{C}$] et de l'alanine [$1\text{-}^{13}\text{C}$] à des vitesses témoins de la progression du cancer (Figure 2-11). Selon le même principe, d'autres métabolites ont été suivis, tels le fumarate [$1,4\text{-}^{13}\text{C}_2$], le lactate [$1\text{-}^{13}\text{C}$], l'acétate [$1\text{-}^{13}\text{C}$], le fructose [$2\text{-}^{13}\text{C}$], et l' α -cétoisocaproate [$1\text{-}^{13}\text{C}$].

D'autre part, le pH extra-cellulaire a été mesuré dans des tumeurs en injectant du $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ hyperpolarisé. La mesure directe du rapport des signaux $\text{H}^{13}\text{CO}_3^- / ^{13}\text{CO}_2$ permet d'accéder au pH.

Parmi les autres techniques produisant l'hyperpolarisation nucléaire, le transfert de polarisation à partir de para-hydrogène a été utilisé en RMN ^{13}C ou ^{19}F , parfois pour produire plus facilement les mêmes métabolites (succinate, pyruvate, ...).^{17,18}

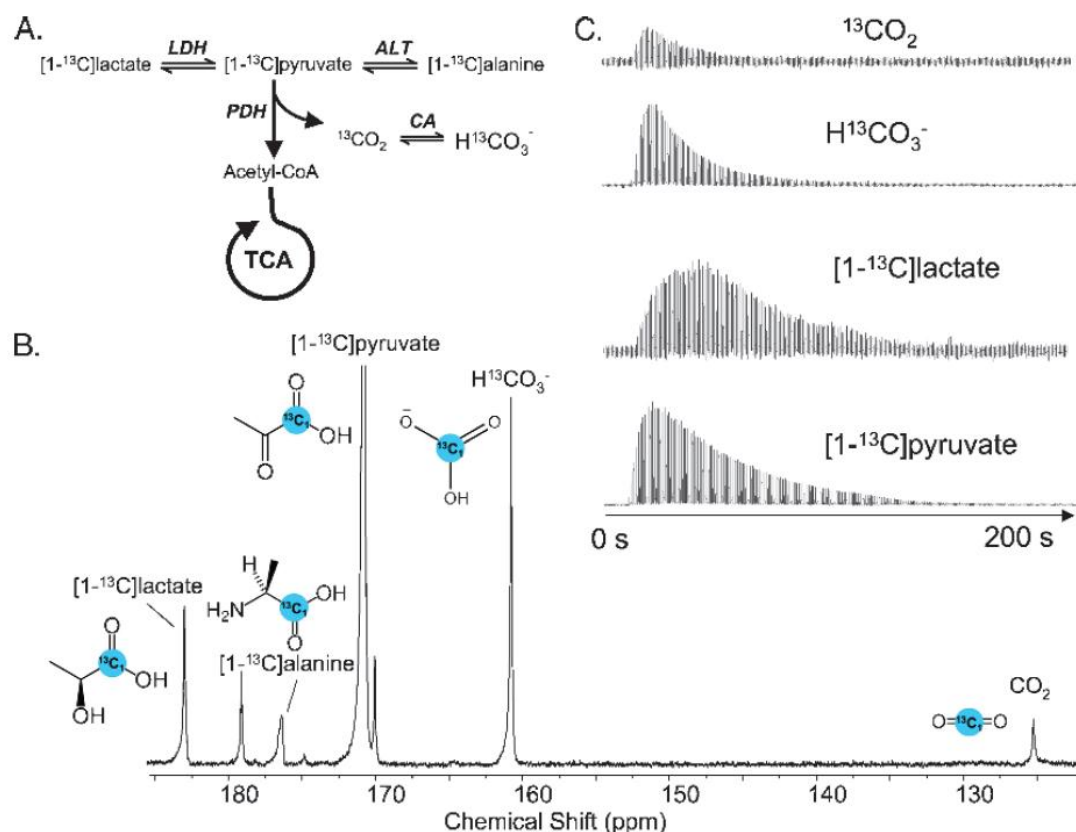


Figure 2-11 : A) Diagramme représentatif du métabolisme du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate qui peut être transformé : en $[1-^{13}\text{C}]$ lactate dans une réaction catalysée par l'enzyme LDH (Lactate Dehydrogenase), en $[1-^{13}\text{C}]$ alanine dans une réaction catalysée par l'enzyme ALT (ALanine Transaminase) et en ^{13}C -dioxyde de carbone dans une réaction catalysée par l'enzyme PDH (Pyruvate Dehydrogenase). Le dioxyde de carbone relaché est ensuite converti en bicarbonate dans une réaction catalysée par l'anhydrase carbonique (notée CA). B) Le spectre RMN du ^{13}C hyperpolarisé permet de mesurer l'assimilation du substrat marqué ainsi que ses produits métaboliques. Par exemple, le spectre RMN ^{13}C du cœur isolé d'un rat perfusé avec du $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate hyperpolarisé donne des pics distincts en 1 scan pour : $^{13}\text{CO}_2$, $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$, $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate, $[1-^{13}\text{C}]$ lactate, et $[1-^{13}\text{C}]$ alanine. C) Les produits hyperpolarisés peuvent également être suivis avec une résolution temporelle d'une seconde et les flux métaboliques calculés à partir d'informations métaboliques. Figure tirée de Merritt et al.¹⁹

La place du xénon hyperpolarisé dans ce domaine de l'imagerie moléculaire peut être importante, puisque la vitesse d'hyperpolarisation élevée combinée à la haute sensibilité apportée par l'étape de pompage optique et le caractère non toxique et exogène de cet atome en font une sonde prometteuse. Encore faut-il que celui-ci soit 'guidé' vers les cibles biologiques d'intérêt. C'est ce que nous décrivons dans les prochains chapitres. Mais intéressons-nous d'abord aux propriétés de ce gaz rare.

2.3. Xénon : Propriétés physiques et RMN

Le xénon a été découvert en 1898 par les chimistes britanniques William Ramsay et Morris William Travers par analyse de résidus de l'air. C'est Ramsay qui proposa de baptiser ce nouveau gaz xénon, du grec *xenos* signifiant étranger, inconnu. Le xénon existe à l'état de traces dans l'atmosphère terrestre avec une concentration de 0.087 partie par million. Il est extrait par distillation de l'air rendu liquide.

Ce gaz monoatomique, noble, inodore et incolore possède un rayon de van der Waals de 2,2 Å. Sa couche de valence étant pleine il en résulte que le xénon est inerte à la plupart des réactions chimiques. Cette caractéristique le rend utilisable pour l'étude de molécules en solution sans risque de les modifier chimiquement. D'autre part, son grand nuage électronique le rend très polarisable et très sensible à toute interaction physique avec son environnement. En résonance magnétique, toute distorsion de ce nuage est ressentie directement au niveau du noyau et par conséquent traduite par une variation du déplacement chimique. Ainsi, la gamme de déplacement chimique du xénon, correspondant à sa fréquence de résonance en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve, couvre un domaine de plus de 300 ppm pour l'espèce monoatomique (du déplacement chimique du xénon gazeux à 0 ppm au déplacement chimique du xénon solide, Figure 2-12).^{20,21,22,23} Pour comparaison, la gamme de déplacement chimique du proton s'étale sur un intervalle de l'ordre de 20 ppm. *In vivo*, le spectre xénon 129 de la tête d'un rat sur un imageur 4,7 T a permis l'obtention de 4 pics résolus attribués au xénon dans la matière grise, dans les muscles de la mâchoire, dans la graisse et dans le plasma sanguin.²⁴

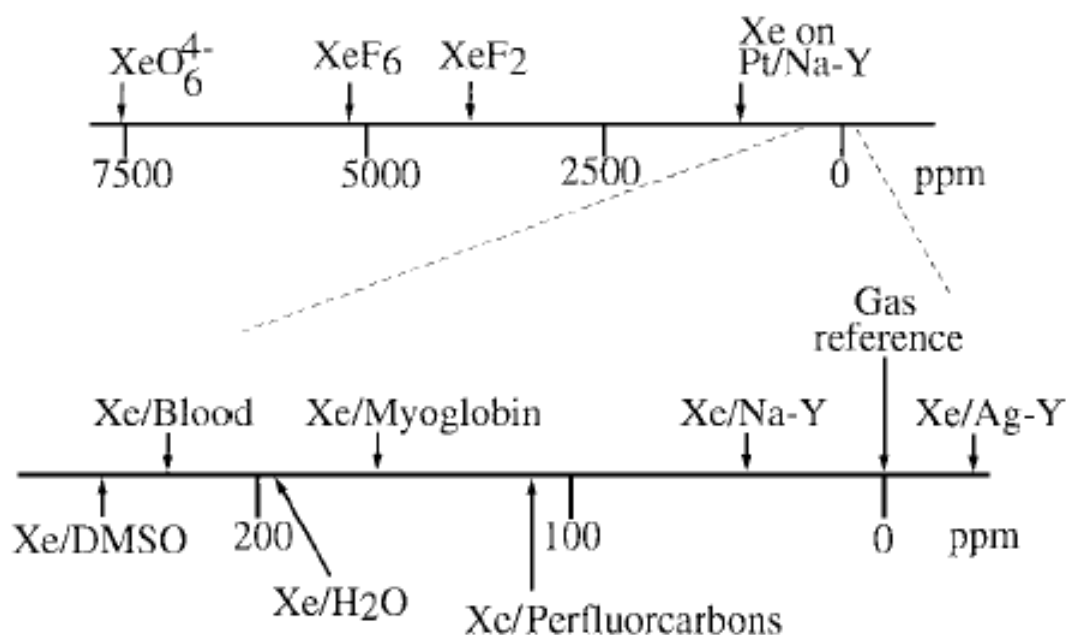


Figure 2-12 : Gamme de déplacement chimique du xénon. Tiré de Goodson.²⁰

Il existe plus de 29 isotopes du xénon dont 9 sont stables et 2 de spins non nul détectables en RMN. Il s'agit du ^{129}Xe de spin $\frac{1}{2}$ et d'abondance naturelle 26,44 % et du ^{131}Xe de spin $\frac{3}{2}$ et d'abondance naturelle 21,24 %. Le xénon 129 étant l'isotope possédant le rapport gyromagnétique le plus élevé (par comparaison avec le proton, son rapport gyromagnétique est tel que : $\gamma^{129\text{Xe}} / \gamma^{1\text{H}} = 0,278$) et le temps de relaxation le plus long, il constitue un gaz de choix pour la RMN. Il est de plus facile à hyperpolariser.

Les premières applications du xénon en routine clinique sur l'homme ont été en tant qu'anesthésiant et datent de 1951. Le xénon est maintenant autorisé comme anesthésiant en Europe depuis 2007.²⁵ Non toxique et soluble dans la plupart des fluides biologiques, le xénon traverse les membranes plasmiques en quelques dizaines de millisecondes.²⁶ Le laboratoire a utilisé très récemment ce traceur pour accéder à la perméabilité membranaire de cellules et en particulier les vitesses d'échange à travers cette membrane, témoin de la résistance ou non à la chimiothérapie.^{27,28} Le xénon a également été utilisé dans le domaine de l'imagerie médicale clinique notamment pour la scintigraphie des poumons (observation de l'isotope radioactif 133)²⁹ et la tomodensitométrie (agent de contraste).

La dernière propriété de ce gaz rare, potentiellement utilisable comme sonde IRM exogène, est que sa polarisation nucléaire peut être augmentée drastiquement. C'est ce que nous décrirons dans le chapitre suivant.

REFERENCES

- (1) Goldman, M. *Historique tiré du texte de M. Goldman* : http://iramis cea.fr/Comm/RMN/Histoire_de_la_RMN_Goldman.pdf.
- (2) Keeler, J. *Understanding NMR Spectroscopy*; John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, 2005.
- (3) Lauterbur, P. C. *Nature* **1973**, 242, 190.
- (4) De Graaf, R. *Image tirée du livre: 'In vivo NMR spectroscopy: principes and techniques', 2nde édition, Ed. Wiley* **2007**.
- (5) Hahn, E. L. *Phys. Rev.* **1950**, 80, 580.
- (6) Images cerveau obtenues à l'université de Virginie USA.
- (7) Hakumäki, J. M.; Liimatainen, T. *European Journal of Radiology* **2005**, 56, 143.
- (8) Urban, J.; Vogel, J. *Methods Mol Biol.* **2009**, 540, 301.
- (9) Akerman, M. E.; Chan, W. C. W.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E. *Proceeding of the national academy of sciences* **2002**, 99, 12617.
- (10) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M. *Science* **2005**, 307, 538.
- (11) Sevick-Muraca, E. M.; Houston, J. P.; Gurfinkel, M. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, 6, 642.
- (12) Houston, J. P.; Thompson, A. B.; Gurfinkel, M.; Sevick-Muraca, E. M. *Photochemistry and photobiology* **2003**, 77, 420.
- (13) Voir par exemple <http://www.visualsonics.com/>.
- (14) Louie, A.; Hüber, M.; Arhens, E.; Rothbacher, U.; Moats, R.; Jacobs, R.; Fraser, S.; Meade, T. *Nature america inc.* **2000**, 18, 321.
- (15) Wu, Y. L.; Ye, Q.; Foley, L. M.; Hitchens, T. K.; Sato, K.; Williams, J. B.; Ho Chien *Proceeding of the national academy of sciences of the united states of America* **2005**, 103, 1852.
- (16) Golman, K.; Ardenkjaer-L, J.; Mansson, S.; Leunbach, L.; Petersson, J. S. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2003**, 100, 10435.
- (17) Golman, K.; Axelsson, O.; Johannesson, H.; Moansson, S.; Olofsson, C.; Petersson, J. *Magn. Reson. Med.* **2001**, 46, 1.
- (18) Kuhn, L. T.; Bommerich, U.; Bargon, J. *Journal of Physical Chemistry* **2006**, 110, 3521.
- (19) Merritt, M.; Harrison, C.; Storey, C.; Jeffrey, F.; Sherry, A.; Malloy, C. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2007**, 50, 19773.
- (20) Goodson, B. M. *Conc. Magn. Reson.* **1999**, 11, 203.
- (21) Kershaw, J.; Nakamura, K.; Kondoh, Y.; Wakai, A.; Suzuki, N.; Kanno, I. *Magn. Reson. Med.* **2007**, 57, 791.
- (22) Zabow, G.; Dodd, S.; Moreland, J.; Koretsky, A. *Nature* **2008**, 453, 1058.
- (23) Brotin, T.; Lesage, A.; Emsley, L.; Collet, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1171.
- (24) Wolber, J.; Ellner, F.; Fridlund, B.; Gram, A.; Johannesson, H.; Hansson, G.; Hansson, L. H.; Lerche, M. H.; Moansson, S.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K.; Ardenkjaer-Larsen, J. H. *Nucl. Instr. Meth. A* **2004**, 526, 173.
- (25) Delhay, O.; Robin, E.; Bazin, J.-E.; Ripart, J.; Lebuffe, G.; Vallet, B. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **2010**, 29, 635.
- (26) Boutin, C.; Desvaux, H.; Carrière, M.; Leteurtre, F.; Jamin, N.; Boulard, Y.; Berthault, P. *NMR Biomed.* **2011**, 24, 1.
- (27) Boutin, C.; Tassali, N.; Berthault, P. **Manuscrit en préparation.**
- (28) Boutin, C.; Berthault, P. *Brevet.* **2011**.
- (29) Kawakami, K. *Ann. Nucl. Med.* **1997**, 11, 67.

Chapitre 3

Hyperpolarisation : Un état hors équilibre

Chapitre 3 - Hyperpolarisation: Un état hors équilibre

3.1. Sensibilité et polarisation en RMN

Plongés dans un champ magnétique B_0 , les moments magnétiques des noyaux de spin $1/2$ s'orientent parallèlement ou anti-parallèlement à celui-ci, créant ainsi des niveaux d'énergie différents. Le rapport des populations présentes dans chacun des niveaux est donné par la statistique de Boltzmann :

$$\frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} = \exp\left(-\frac{E_{\downarrow} - E_{\uparrow}}{kT}\right)$$

Avec N_{\uparrow} le nombre de spins dans l'état $m_I = 1/2$, N_{\downarrow} le nombre de spins dans l'état $m_I = -1/2$, $N = N_{\uparrow} + N_{\downarrow}$ est le nombre total de spins, k la constante de Boltzmann et T la température (K). On définit également l'énergie E de chacun des niveaux :

$$E = -m_I \hbar \gamma B_0 \quad \text{soit} \quad E_{\downarrow} = \frac{\hbar \gamma B_0}{2} \quad \text{et} \quad E_{\uparrow} = -\frac{\hbar \gamma B_0}{2}$$

Ainsi la différence d'énergie entre les 2 niveaux est : $\Delta E = \hbar \gamma B_0$ où γ est le rapport gyromagnétique du noyau qui correspond à sa sensibilité au champ magnétique et \hbar la constante de Planck divisée par 2π .

On obtient donc le rapport des populations suivant :

$$\frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} = \exp\left(-\frac{\hbar \gamma B_0}{kT}\right)$$

On introduit la grandeur macroscopique de polarisation nucléaire P qui représente à l'équilibre, la différence de population entre les niveaux d'énergie sur leur somme :

$$P = \frac{|N \downarrow - N \uparrow|}{N \downarrow + N \uparrow} = \tanh\left(\frac{\hbar\gamma B_0}{2kT}\right)$$

Etant donné les faibles valeurs de champ et pour une température ambiante de l'ordre de 300 K on a généralement : $\frac{\hbar\gamma B_0}{kT} \ll 1$

D'où une polarisation qui tend vers :

$$P \approx \frac{\hbar\gamma B_0}{2kT}$$

Par exemple, à 7 T à température ambiante on aura pour le proton dont le rapport gyromagnétique est égal à $42,58 \cdot 10^6 \text{ Hz} \cdot \text{T}^{-1}$, une polarisation de l'ordre de $2 \cdot 10^{-5}$. Cette polarisation est encore plus faible pour les autres noyaux observables en RMN puisque leur rapport gyromagnétique est inférieur à celui du proton (tritium excepté).

En RMN classique le signal est proportionnel à la dérivée par rapport au temps de l'aimantation transversale de l'échantillon étudié. Celle-ci est liée à la polarisation par la relation suivante :

$$M = \frac{1}{2} N \hbar \gamma P$$

La faible valeur de l'aimantation à l'équilibre thermodynamique rend la méthode RMN très peu sensible. Afin de pallier ce problème de sensibilité, deux méthodes dites de « force brute » sont théoriquement accessibles. L'une consiste à augmenter la valeur du champ magnétique B_0 , l'autre à diminuer la température. En pratique augmenter le champ B_0 est très difficile et très coûteux. En ce qui concerne la diminution de température c'est une solution inappropriée pour la plupart des échantillons, surtout biologiques. Il existe également des techniques de pré-polarisation qui consistent à appliquer une faible température (de l'ordre de 2 à 3 K) et un haut champ magnétique (de l'ordre de 8 T) à l'échantillon avant l'expérience RMN puis de le réchauffer et de le transporter jusqu'au spectromètre d'étude. Les conditions contraignantes de cette technique concernent le T_1 . D'une part le T_1 doit être tel que le temps de pré-polarisation (t_p) soit au moins 5 fois plus

grand que le T_1 de l'échantillon ($t_p > 5 T_1$) et d'autre part le temps ' t_e ' : de transport, de réchauffage et d'expérience de mesure RMN doit très petit devant T_1 ($t_e \ll T_1$).

Pour remédier plus aisément à ce manque de sensibilité la solution est de se diriger vers la résonance magnétique des espèces hyperpolarisées. Avec ces méthodes il devient possible d'obtenir un signal exploitable bénéficiant d'une grande sensibilité à partir d'un état hors équilibre obtenu par l'une des trois techniques : polarisation nucléaire dynamique, para-hydrogène et pompage optique.

3.2. Polarisation Nucléaire Dynamique

La Polarisation Nucléaire Dynamique, dénotée DNP (Dynamic Nuclear polarisation) est une technique d'hyperpolarisation qui permet d'augmenter le signal RMN en transférant la polarisation des spins électroniques vers les spins nucléaires. Lors d'une expérience de DNP la polarisation des électrons à l'équilibre de Boltzmann, environ 700 fois plus élevée que celles des protons, est transférée aux noyaux.

C'est en 1953 qu'Albert Overhauser propose pour la première fois un modèle où la saturation des électrons dans un métal produit une large polarisation des spins nucléaire du métal.^{1,2} Les expériences d'hyperpolarisation par DNP ont depuis été réalisées tant sur les solides que les liquides. Quatre mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer ce transfert de polarisation entre les spins électroniques et nucléaires au moyen d'une irradiation micro-onde : l'effet Overhauser, l'effet Solide, l'effet croisé et le mélange thermique.

Dans l'état liquide, le phénomène prépondérant est l'*Effet Overhauser*. Lors de ce processus, la grande polarisation de Boltzmann des électrons célibataires est transférée aux noyaux voisins par saturation de la transition de résonance paramagnétique électronique (RPE) correspondante. Le phénomène qui intervient est la relaxation croisée (mécanisme de flip-flop électron-noyau).

Les autres mécanismes sont dédiés à l'état solide. Trois paramètres régissent ces mécanismes : la largeur de raie de la RPE homogène δ , la largeur spectrale inhomogène Δ et la fréquence de Larmor nucléaire ν_{0I} .

L'effet Solide apparaît lorsque l'on envoie une irradiation micro-onde à la fréquence $\nu_{0S} - \nu_{0I}$ (ce qui nécessite une forte puissance). De fait, cet effet requiert que Δ et δ soient plus petits que ν_{0I} . Les radicaux majoritairement utilisés dans ce cas sont le BDPA (1,3-bisdiphenylene-2-phenylallyl) et le trityl.¹ Les probabilités de transitions utiles, (et donc le facteur d'exaltation) étant proportionnelles à $1/\nu_{0I}^2$ ce mécanisme est défavorisé à haut champ magnétique.

L'effet croisé est un mécanisme qui ne devient dominant qu'à haut champ magnétique ($> 5T$). Pour ce faire Δ doit être plus grand que ω_{0I} qui doit être plus grand que δ . Dans cette méthode des bi-radicaux sont utilisés pour favoriser un mécanisme à trois spins (2 électrons $S1$ et $S2$ en interaction dipolaire, pour lesquels $\omega_{0S2} - \omega_{0S1} = \omega_{0I}$). Le TOTAPOL (1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino)propan-2-ol) est le bi-radical le plus utilisé.³

Enfin, *le mélange thermique* qui, lui, nécessite une grande quantité de paramagnétique (de type TEMPO : radical 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxy) se doit de vérifier la condition $\Delta > \nu_{0I}$. Il met en œuvre des couplages dipolaires multiples et l'on raisonne alors en température de spin électronique.⁴

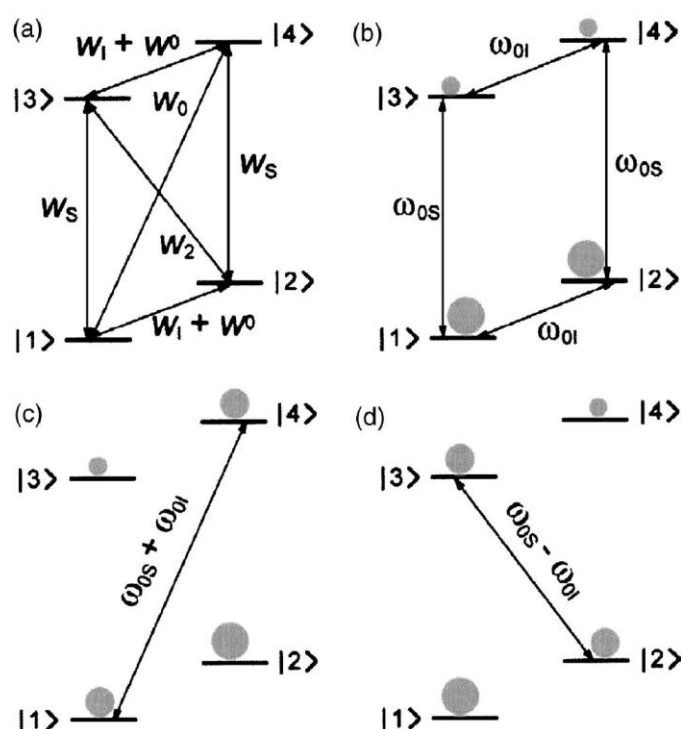


Figure 3-1 : Diagramme d'énergie pour l'effet Overhauser et l'effet solide. Le diagramme a) décrit les taux de transitions importants pour l'effet Overhauser, le b) décrit la population d'équilibre thermique pour un système de 2 spins. En gris sont représentées les populations de spins. Les schémas c) et d) représente la saturation des transitions interdites zéro-quantum et double-quantum donnant un gain négatif ou positif pour l'effet solide.²

L'instrumentation relative aux expériences de DNP nécessite un spectromètre de RMN, une source de micro-onde, un guide d'onde pour transmettre l'irradiation micro-onde de la source à la sonde RMN, ainsi qu'une sonde RMN multifréquence (généralement ^1H , ^{13}C , ^{15}N). Le choix de la source micro-onde dépend essentiellement de la nature de l'expérience de DNP à mener. Les deux types de sources principales sont celles dite de l'état solide pour les cas de faible puissance et celles disposant d'un dispositif à cavité électronique lorsque des fortes puissances sont requises. Le dispositif à cavité électronique le plus adapté est le gyrotron. Pour la gamme de fréquence d'intérêt pour la DNP et la RMN, le gyrotron est le seul appareil capable de fournir le niveau de puissance suffisant allant jusqu'au terahertz. Son fonctionnement est similaire à celui d'un cyclotron. Dans un gyrotron les électrons sont émis par une cathode puis accélérés dans un champ magnétique intense. En traversant le champ magnétique, les électrons précessent à une fréquence spécifique. C'est dans la cavité du cœur du gyrotron que le rayonnement est fortement amplifié atteignant le terahertz. Un

convertisseur de mode produit en sortie du dispositif un faisceau gaussien. Le faisceau obtenu est couplé à un guide d'onde qui sera dissipé par un collecteur en fin de parcours. A ce jour il existe 3 gammes de fréquences de gyrotron. Un de 140 GHz, un d'environ 200 GHz et un de l'ordre de 460 GHz.

A priori tous les noyaux (par exemple ^{13}C , ^{15}N et ^{31}P) peuvent être hyperpolarisés, de manière plus ou moins efficace. Le gain en polarisation pour un noyau donné est de l'ordre de la centaine par rapport à sa polarisation à l'équilibre thermique.⁵

En DNP de dissolution on distingue trois étapes: i) la polarisation de l'échantillon par une irradiation micro-onde à faible température (de l'ordre de 1K), puis ii) la dissolution de l'échantillon dans un solvant chaud et son transport vers le spectromètre ou l'imageur. Enfin iii) le transfert de la solution dans un tube RMN ou l'injection de celle-ci dans un animal. En DNP de dissolution, la méthode peut être appliquée à une grande variété de molécules,⁵ dont le xénon.⁶

3.3. Para-hydrogène

La molécule de dihydrogène, H_2 , est constituée de deux atomes d'hydrogène liés par une liaison covalente. Il existe 2 isomères de cette molécule. Lorsque les spins des noyaux d'hydrogène sont orientés parallèlement, on dit que l'isomère est dans une configuration ORTHO de spin nucléaire total $I=1$. Lorsque les spins nucléaires sont orientés anti-parallèlement, leur configuration est dite PARA et leur spin nucléaire total est $I=0$. Dans la configuration para-hydrogène les spins nucléaires sont dans un état singulet et sont situés dans le plus bas niveau d'énergie. À température ambiante, la répartition est de 75% d'ortho-hydrogène et 25% de para-hydrogène. A 77K (température de l'azote liquide), la répartition est d'environ 50:50 pour les deux isomères. La transition d'ortho à para est très lente, un catalyseur est nécessaire pour accélérer cette étape. Une fois séparé du catalyseur, le para-hydrogène est très stable à température ambiante. Sa polarisation peut perdurer pendant des heures voire des jours.

La technique d'hyperpolarisation par para-hydrogène se déroule en 3 étapes. Dans un premier temps il y a production de para-hydrogène, puis réaction d'hydrogénation ou d'addition sur un catalyseur et enfin transfert de polarisation de l'hydrogène vers d'autres noyaux.

La première étape de production de para-hydrogène consiste à abaisser la température en présence d'un catalyseur métallique pour augmenter la cinétique de réaction afin d'obtenir une population de dihydrogène dans une configuration favorable au para-hydrogène. Cette réaction reste l'étape la plus longue malgré l'ajout d'un catalyseur métallique.⁷

Le dihydrogène, qui vient réagir sur la molécule à polariser, rend les atomes précédemment sur la molécule de di-hydrogène magnétiquement inéquivalents, donc détectables en RMN du ^1H avec une polarisation « pure ». Il existe 2 méthodes de transfert de polarisation à partir de para-hydrogène : PASADENA à haut champ magnétique (Figure 3-2) et ALTADENA à bas champ.⁷

Enfin la dernière étape admet un transfert de polarisation entre ces protons et les autres noyaux de la molécule à hyperpolariser par couplage scalaire.⁷

Ainsi des atomes tels que le ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P peuvent être hyperpolarisés. La polarisation atteinte est de l'ordre de 0,7.

L'inconvénient de cette méthode réside dans la modification irréversible de la formule chimique sous-jacente à l'étape d'hydrogénation.

Une alternative à ce problème a été proposée par le biais de la méthode SABRE qui utilise un catalyseur de Crabtree recevant à la fois les 2 hydrogènes qui deviennent inéquivalents et le substrat. Par transfert de polarisation lorsqu'à la fois les hydrogènes et le substrat se trouvent sur le catalyseur, le substrat se trouve polarisé, sans que sa structure chimique ait été modifiée (Figure 3-3).⁵

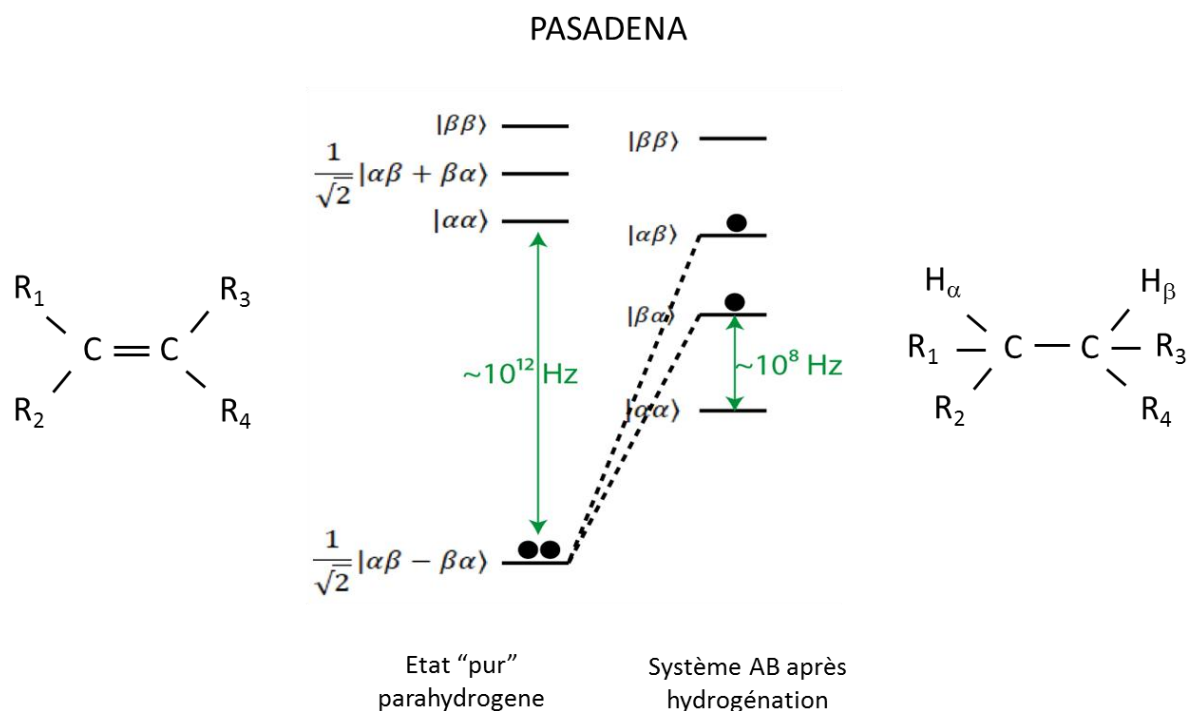


Figure 3-2 : Schéma représentatif de la méthode PASADENA. A gauche sont représentés les niveaux d'énergie pour le parahydrogène « pur », à droite est représenté le système AB après hydrogénation. PASADENA peuple spécifiquement les niveaux $|\alpha\beta\rangle$ et $|\beta\alpha\rangle$.

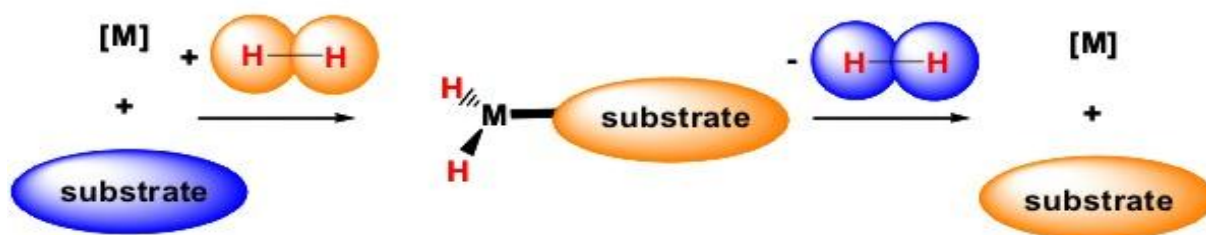


Figure 3-3 : Schéma représentatif de la technique SABRE.⁵ En bleu sont représentés les éléments avant polarisation, en jaune ceux après polarisation. La lettre M désigne le catalyseur.

3.4. Pompage optique

3.4.1. Méthode de pompage optique par échange de spin

En 1950, Alfred Kastler établit le principe du pompage optique.⁸ Il reçut en 1966 le Prix Nobel pour le développement de la technique qui permet de modifier l'état des atomes à l'aide d'une irradiation lumineuse polarisée. Il démontre que selon le sens de polarisation de la lumière, il est possible de modifier drastiquement les populations des niveaux d'énergie atomiques.

A l'heure actuelle deux méthodes optiques sont utilisées pour produire des gaz nobles hyperpolarisés. La méthode de pompage optique par échange de spins (SEOP en anglais) à partir d'un métal alcalin a été la première méthode proposée historiquement. C'est en 1960 que Bouchiat et al. ont observé que la polarisation des spins nucléaires des atomes de gaz rare présent initialement comme tampon dans la cellule de pompage se trouvait augmentée considérablement par collision du fait du transfert du moment angulaire des spins électroniques des atomes alcalins vers les spins nucléaires des atomes des gaz rares.⁹ En pratique cette technique a été mise en place par William Happer et son équipe en 1984.¹⁰ Cette méthode peut être appliquée à des gaz rares tels que le xénon 129 et l'hélium 3 pour obtenir une polarisation atteignant les 70 % (dans le cas de l'hélium).¹¹ L'hélium hyperpolarisé peut également être obtenu par la technique d'échange de métastabilité (MEOP) sans avoir recours à un métal alcalin.^{12,13} Dans cette méthode le moment angulaire des photons est directement transféré aux atomes d'hélium 3. Cette opération est réalisée à faible pression (de l'ordre du mbar) et en beaucoup moins de temps que pour la méthode d'échange de spin (de l'ordre de quelques secondes). Dans ce processus, quelques atomes d'hélium (fraction de l'ordre de 10^{-6}) sont excités par une décharge électrique à un état d'énergie métastable où ils peuvent absorber une lumière à 1083 nm pour être optiquement polarisés (Figure 3-4).¹⁴ Cette technique permet la polarisation des atomes d'hélium de façon très efficace en n'utilisant qu'un gaz d'hélium pur. La polarisation par échange de métastabilité peut atteindre les 92 %. Seules de faibles quantités d'hélium peuvent être hyperpolarisées par cette méthode qui possède cependant un rendement quantique élevé.

Ce procédé peut théoriquement être aussi utilisé pour le xénon 129 mais ne l'est que très peu en pratique car, le xénon étant un atome lourd, ses règles de sélection sont moins strictes, et son état métastable a une durée de vie beaucoup plus courte. L'état métastable 3S_1 de l'hélium a une durée de vie lui de l'ordre de 8000 s.

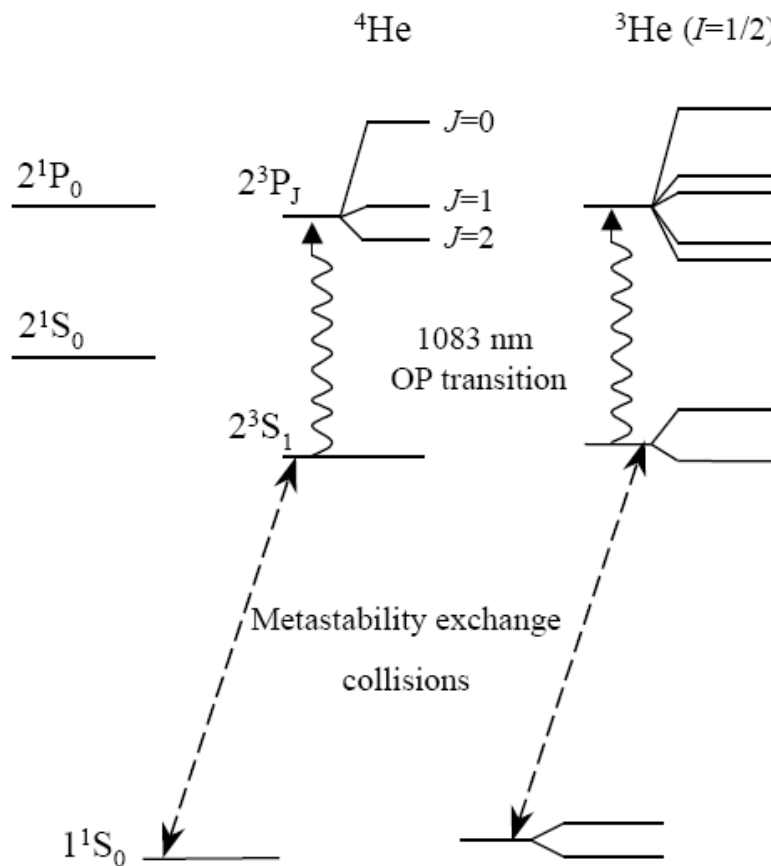


Figure 3-4 : Schéma représentatif de la méthode de pompage optique par échange de métastabilité (MEOP) pour l'hélium 3 et 4.^{15,12}

Nous décrivons dans cette partie la méthode d'hyperpolarisation par échange de spins (SEOP). Cette technique peut être vue comme étant un processus constitué de deux parties indépendantes et successives. Dans une première étape nous considérerons le transfert du moment angulaire des photons de la lumière irradiante aux spins électroniques d'un alcalin tel que le Rubidium. Dans la seconde étape, nous étudierons le transfert de cette polarisation électronique vers les spins nucléaires des atomes du xénon 129.

3.4.1.1. 1^{ère} étape : Polarisation des spins électroniques d'un métal alcalin

Le principe repose sur l'utilisation de règles de sélection régissant l'interaction lumière-atome et sur la conservation du moment angulaire des photons. Les règles de sélection pour une transition électronique sont $\Delta l = \pm 1$ et $\Delta m_j = 0, \pm 1$. Une lumière polarisée linéairement à la longueur d'onde adéquate excitera une transition avec $\Delta m_j = 0$, une lumière polarisée circulairement gauche σ^+ une transition avec $\Delta m_j = +1$ et une lumière polarisée circulairement droite σ^- une transition avec $\Delta m_j = -1$.

Le pompage optique est appliqué à des métaux alcalins tels que le rubidium (un seul électron de valence). Cet alcalin possède un état fondamental $^2S_{1/2}$ qui possède deux sous-niveaux magnétiques $m_j = \pm 1/2$ et deux états excités $^2P_{1/2}$ et $^2P_{3/2}$ (on néglige pour l'instant le spin nucléaire de l'alcalin). Les transitions optiques entre ces deux niveaux électroniques donnent les raies spectrales D₁ et D₂ caractéristiques des alcalins. Pour le rubidium D₁ et D₂ sont respectivement à 794,7 et 780 nm. En présence d'un champ magnétique statique et d'une pression suffisante, il y a levée de dégénérescence des niveaux de spin. Chacun des niveaux énergétiques se subdivise en sous-niveaux Zeeman. L'expérience consiste donc à irradier les atomes du rubidium avec une lumière polarisée à la longueur d'onde de 794,7 nm correspondant à la transition D₁. Les photons avec lesquels on irradie le rubidium possèdent un moment cinétique $\Delta m_j = \pm 1$ selon que la lumière est polarisée circulairement droite ou circulairement gauche. Parmi toutes les transitions possibles entre $m_s = \pm 1/2$ et $m_j = \pm 1/2$, seules les transitions qui conservent le moment cinétique sont possibles. A l'équilibre thermique, les deux sous-niveaux de l'état fondamental sont peuplés (avec une distribution de Boltzmann pour les électrons). Une lumière de polarisation circulaire σ^+ ne peut être absorbée que par des atomes dans l'état $^2S_{1/2}$ avec $m_s = -1/2$. L'état $^2P_{1/2}$ avec $m_j = +1/2$ est alors peuplé. A la suite de collisions avec des atomes de gaz dans la cellule, le niveau excité $m_j = +1/2$ de $^2P_{1/2}$ se dépeuple et peuple chacun des sous-niveaux $m_j = \pm 1/2$ de l'état fondamental avec des taux de désexcitation équiprobables entre les niveaux $m_j = -1/2$ et $m_j = +1/2$ de l'état $^2S_{1/2}$. Ainsi le niveau $m_j = +1/2$ de l'état fondamental n'est pas excité en raison des contraintes imposées par les règles de sélection et il se peuple au fur et à mesure que l'état supérieur se désexcite (Figure 3-5). Il en

résulte donc une polarisation de l'état fondamental des spins des électrons de valence du rubidium.

La probabilité de désexcitation radiative d'un atome de rubidium dans l'état excité $^2P_{1/2}$ est inversement proportionnelle à la pression d'azote ajoutée.¹⁶ Pour éviter ce phénomène émettant des photons de polarisation quelconque pouvant s'opposer au pompage optique, on introduit dans la cellule de pompage un gaz tampon tel que l'azote. Une pression minimale de 50 torr est nécessaire (760 torr = 1 bar).^{17,18}

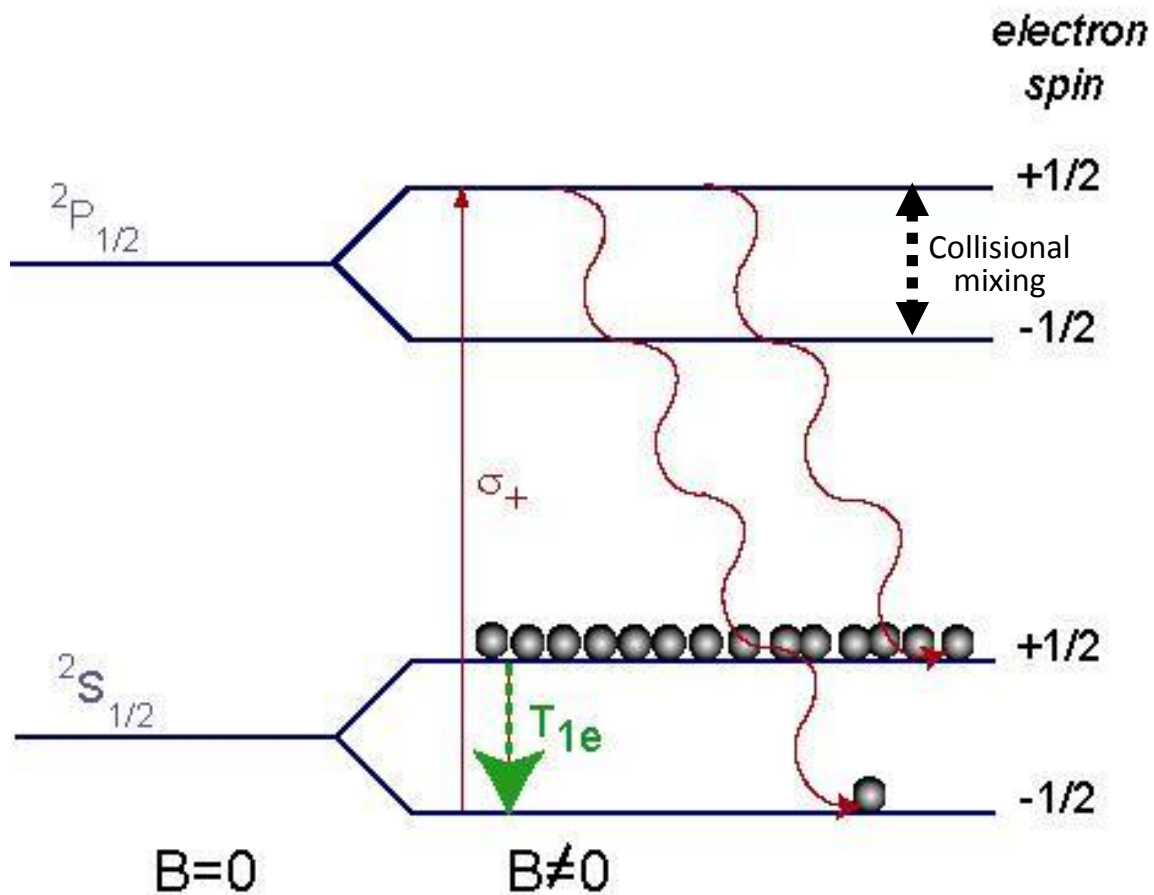


Figure 3-5 : Schéma décrivant l'état fondamental et le premier état excité d'un alcalin en absence et en présence de champ magnétique, en négligeant le spin nucléaire. La transition σ_+ est représentée. T_{1e} est le temps de relaxation longitudinale de l'électron.

3.4.1.2. 2^{ème} étape : Polarisation des spins nucléaire du xénon

Les atomes alcalins pompés optiquement peuvent échanger leur polarisation de spin électronique avec les spins nucléaires du xénon par collision comme l'a montré Grover en 1978.¹⁹ Les collisions entre les atomes de xénon et de rubidium polarisé entraînent un transfert partiel de polarisation par couplage hyperfin entre le spin électronique du rubidium et le spin nucléaire du xénon 129. Ce transfert s'effectue durant une collision à deux corps ou à trois corps avec le gaz tampon N₂ via la formation temporaire d'une molécule de type van der Waals Rb-Xe (Figure 3-6).

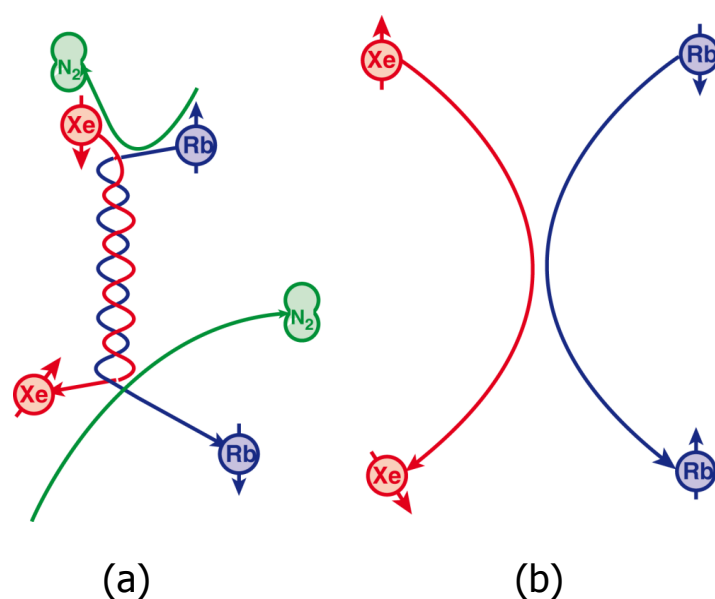


Figure 3-6 : Transfert de polarisation par échange de spins (a) par collision à trois corps (plus efficace) et (b) par collision à deux corps (plus probable).

Au final, de par la présence d'azote (qui minimise donc les désexcitations radiatives non souhaitées et qui favorise le transfert par collision à trois corps), un niveau élevé de polarisation du xénon est obtenu. Une description quantitative du processus d'échange de spin est donnée par William Happer.¹⁰ En somme, le signal RMN du xénon trouve désormais son origine dans une polarisation optique et non plus thermique (définie par la distribution de Boltzman) ce qui multiplie drastiquement le signal.

3.4.2. Réalisation expérimentale

3.4.2.1. Montage n°1 à base de laser titane-saphir

La valeur de la polarisation dépend considérablement des conditions expérimentales. Nous décrivons ici le montage 1 développé depuis 1998 au laboratoire qui permet d'obtenir du xénon 129 hyperpolarisé à partir de lasers. Un laser Argon ionisé en mode continu (modèle Spectra Physics 2080) est utilisé comme pompe d'un second laser Titane : Saphir accordable en longueur d'onde (modèle Spectra Physics 3900S). Au laboratoire, ces deux lasers sont disposés parallèlement sur une même table en granit. On utilise des miroirs pour la propagation du faisceau entre la sortie du laser Argon et l'entrée du laser Titane:Saphir. Le laser Argon délivre un faisceau de 20-25 W dans le vert à une longueur d'onde comprise entre 450 et 520 nm. Le laser Titane:Saphir reçoit ce faisceau et émet en sortie un faisceau infrarouge de 5-6 W réglable à la longueur d'onde de la transition D1 du rubidium (794,7 nm). Ce faisceau a pour destination la cellule de pompage qui est chauffée pour vaporiser un peu de rubidium. La cellule contient aussi du xénon et de l'azote. Avant d'atteindre cette cellule, le faisceau lumineux passe par un extenseur qui l'élargit de 1 à 20 mm. Ce diamètre de faisceau correspond au diamètre de la cellule de pompage (légèrement inférieur à celle-ci). Après avoir été élargi et avant d'atteindre la cellule, le faisceau traverse un cube séparateur de polarisation à la sortie duquel la polarisation rectiligne est transformée en polarisation circulaire par une lame quart d'onde placée en aval du cube. C'est ce faisceau polarisé circulairement qui atteindra enfin la cellule de pompage.

3.4.2.2. Cellule de pompage

La cellule faite de verre est constituée d'une double enveloppe. Elle est cylindrique et son enveloppe interne mesure 25 mm de diamètre et 130 mm de longueur. Son volume est de 64 ml. L'enveloppe externe permet l'arrivée du flux d'azote chauffé autour de 355 K par une résistance récupérée d'un spectromètre afin de vaporiser le rubidium. La composition en gaz a été déterminée afin d'obtenir les meilleurs taux de

ainsi que la cellule sont traités avec une solution piranha (mélange avec 60% d'acide sulfurique et 40% de peroxyde d'hydrogène) afin de s'affranchir de tout composé organique à sa surface, puis rincés à l'eau et avec une solution d'acide fluorhydrique pour éliminer la présence des ions métalliques. Enfin après un dernier rinçage à l'eau et un séchage de 24h dans un four à 100 °C, l'ensemble est recouvert d'une solution de 10 % de Surfasil (dichlorooctaméthyltetrasiloxane) dilué dans du toluène avant d'être une dernière fois rincé au méthanol et séché dans les mêmes conditions.^{20,21}

3.4.2.3. Collecte du xénon hyperpolarisé

A la sortie des bobines et dans le prolongement du circuit de verre qui provient de la cellule se trouve un tube en forme de U dans lequel est collecté le xénon fraîchement hyperpolarisé. Ce tube en U est plongé dans un solénoïde (alimenté par une batterie de voiture) créant un champ magnétique de 300 mT, qui est lui-même plongé dans de l'azote liquide à 77 K afin de conserver de façon optimale le xénon hyperpolarisé sous forme congelé. L'azote qui était mélangé au xénon dans la cellule passe également par le tube en U mais est immédiatement évacué vers une pompe à vide. Le xénon issu de plusieurs pompages successifs peut y être condensé permettant ainsi une production en « cryo-accumulation » de gaz hyperpolarisé pouvant aller jusqu'à la dizaine de ml (Figure 3-8). Le T_1 du xénon dans ces conditions est de quelques heures.

Le chariot transportant le xénon hyperpolarisé (ainsi que le matériel nécessaire à son transport : Dewar d'azote liquide, solénoïde et batterie d'alimentation du solénoïde) jusqu'au spectromètre de mesure est photographié en figure 3-9.

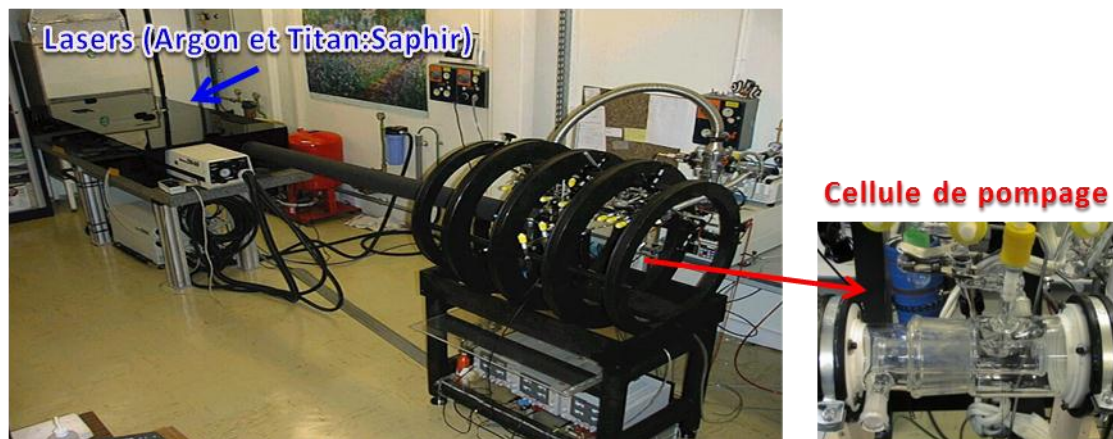


Figure 3-8 : Photo de l'ensemble du montage expérimental et détail de la cellule de pompage.

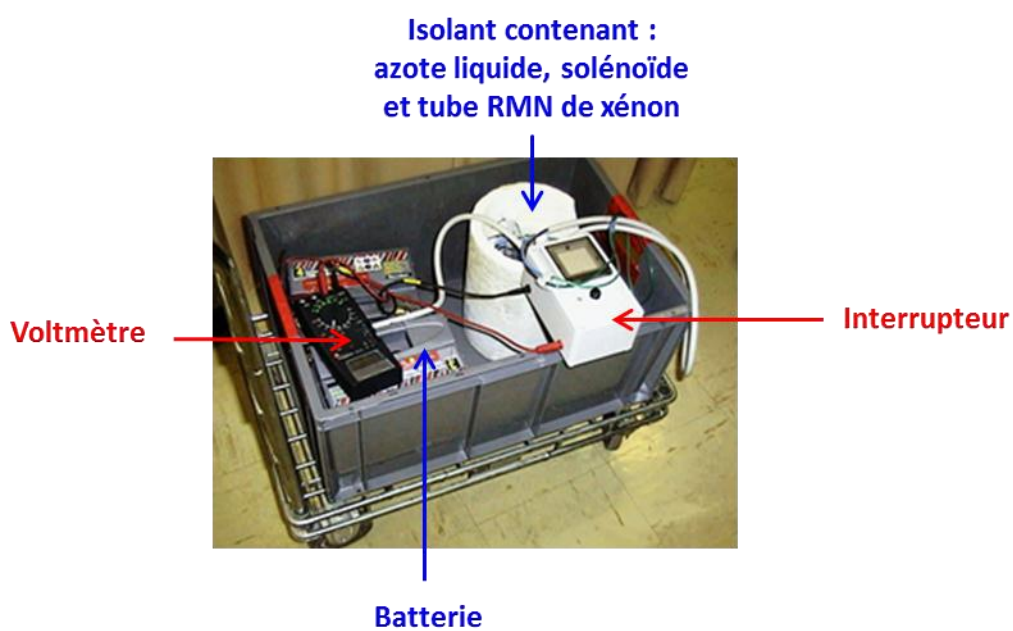


Figure 3-9 : Photo du système de transport du xénon hyperpolarisé du montage de pompage optique au spectromètre.

Le schéma de principe du montage 1 est représenté en figure 3-10.

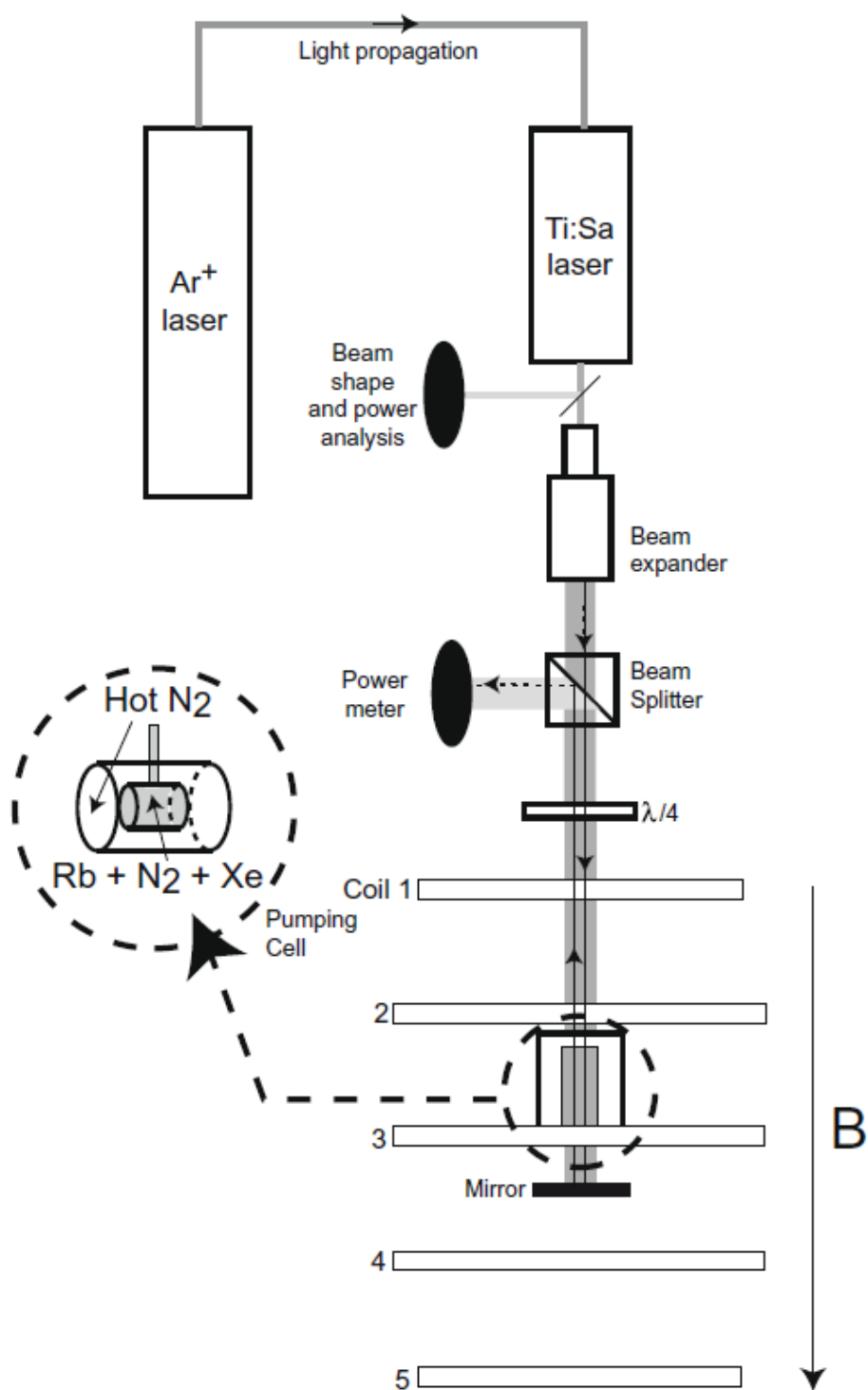


Figure 3-10 : Schéma du dispositif expérimental du montage de pompage optique n°1.

3.4.3. Résultats d'hyperpolarisation

L'asymptote de polarisation du xénon est obtenue après environ 10 minutes (ainsi qu'il avait été mesuré par un petit spectromètre à base de bobines croisée *in situ*) et on collecte environ 1,5 ml de xénon hyperpolarisé sous une pression de 1 bar dans le tube en U. Dans le spectromètre RMN la polarisation atteint 0,5 ce qui signifie que 3 spins nucléaires du xénon sur 4 sont alignés dans le même sens par rapport à la direction du champ statique B.²² Au final, cela se traduit par un gain en sensibilité de 45000 par rapport au xénon à l'équilibre thermique à 11,7 T (et de 75000 à 7 T) à température ambiante pour lequel la polarisation de Boltzmann vaut $1,12 \cdot 10^{-5}$.

3.5. Pompage optique à partir de diodes lasers

3.5.1. Motivation et Principe

Les petites quantités de xénon fortement hyperpolarisé obtenues jusqu'à maintenant à partir des lasers du montage 1 ont été utilisées entre autres pour l'étude et la caractérisation des molécules hôtes et relèvent principalement du domaine de la RMN en solution ou *in vitro*. Avec le passage à l'*in vivo* et l'IRM, nous avons entrepris le développement d'un second montage pour répondre à la nécessité de produire des quantités beaucoup plus importantes de xénon hyperpolarisé en un temps considérablement réduit, pour enfin aboutir à une production en flux continu. L'alternative choisie pour ce montage 2 a été d'utiliser des diodes laser pour irradier la cellule de pompage optique. Les avantages que présentent les diodes par rapport aux lasers sont nombreux : coût à l'achat plus faible et fonctionnement beaucoup plus économique en électricité et en eau (le laser Argon pour son refroidissement consomme 20 L d'eau par minute), etc. Les différences principales entre ces deux systèmes résident dans la puissance fournie par les diodes et leur largeur de raie. Au laboratoire, les diodes laser disposent d'une

puissance pouvant aller jusqu'à 30 W par diode (système Coherent Duo-FAP) contre 6 W au maximum pour le laser Titane:Saphir. L'emploi de diodes laser implique une grande largeur de raie ce qui diminue fortement l'efficacité du pompage optique, étant donné que cette largeur ne correspond plus à la bande d'absorption du rubidium. À défaut de ne pouvoir réduire cette largeur de raie dans le cas des diodes, la solution est d'élargir la bande d'absorption du rubidium en augmentant la pression dans la cellule avec un autre gaz inerte : l'Hélium car celui-ci présente les plus faibles vitesses de destruction de spin (voir terme SD de la partie simulation). L'élargissement par la pression de la raie d'absorption du rubidium est de 18,6 GHz/amg.²³ L'amagat (noté amg) est défini comme étant la densité d'un gaz idéal à 0°C dans les conditions normales de température et de pression ; 1 amg = $2,69 \cdot 10^{19}$ atomes par cm^3 . L'équivalence entre nm et GHz est : 1 nm = 475 GHz. Les pressions mises en jeu dans notre cas sont de l'ordre de 3 à 10 bar ce qui revient donc à élargir la raie d'absorption de 0.13 à 0.40 nm environ.

Sur ce principe, nous avons entrepris le développement d'un second montage prenant en compte les difficultés techniques liées aux hautes pressions.

La figure 3-11 présente le montage de pompage optique 2. Le bâti en aluminium sur lequel repose tout le système de pompage optique a été construit par Christian Chauvin et Louis Liagre de l'atelier de mécanique de l'IBITEC-S. Un dispositif et un protocole de sécurité ont également été mis en place pour répondre aux normes en vigueur concernant l'utilisation de telles puissances laser. Le dispositif sécurité contient un cache recouvrant la cellule de pompage et un tube PVC 'cache faisceau' allant de l'unité de polarisation circulaire à l'entrée de la cellule de pompage afin d'éviter toute réflexion indésirable. Pour le protocole de sécurité nous avons mis en place la marche à suivre suivante : isolement de la pièce avec rideaux et stores adaptés aux faisceaux lasers, port de lunettes laser et enclenchement d'une verrine d'avertissement de la mise en route du laser.

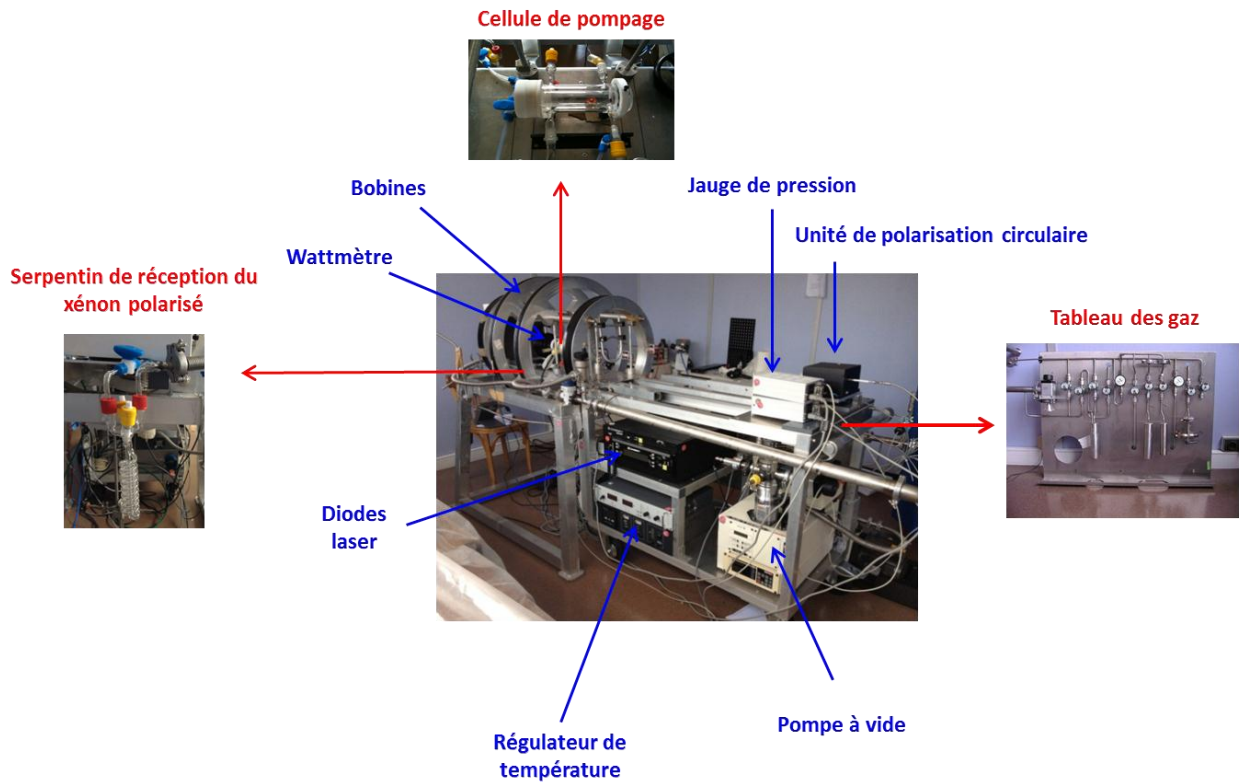


Figure 3-11 : Photo de l'ensemble du montage expérimental.

3.5.2. Réalisation expérimentale

3.5.2.1. Diodes lasers

Nous avons acheté pour réaliser ce montage un système de deux diodes laser DUO FAP 2x30 W (Coherent) de largeur spectrale donnée pour 2.01 nm. Les faisceaux sont fibrés et se rejoignent à l'entrée d'un homogénéiseur. Ensuite le faisceau traverse un polariseur Coherent qui contient un cube séparateur de polarisation, un miroir et pour chacune des polarisations une lame quart d'onde pour créer une lumière polarisée circulairement. La convergence des 2 faisceaux est d'environ 5° ce qui permet de les faire se rejoindre à 132 cm du polariseur, sur la face d'entrée de la cellule. Le diamètre de chaque faisceau issu des diodes est de 2,5 cm ce qui est proche du diamètre de la cellule de pompage optique.

La première étape à la réception des diodes a été de tester les données constructeur. Les informations théoriques fournies avec l'appareillage donnent une température de Peltier de 17.9 °C pour la longueur d'onde de 794.7 nm pour la diode D1 et 11.4 °C pour la diode D2, indépendamment de la puissance. Cependant, la puissance électrique n'est pas totalement convertie en puissance lumineuse (rendement de conversion électrique/optique de l'ordre de 50%), le reste étant dissipé en chaleur. Ainsi, la circulation d'un courant électrique induit un échauffement de la diode, et donc une modification de la longueur d'onde d'émission. Il nous a paru donc important de calibrer les valeurs de température des Peltiers de chaque diode à différentes puissances pour la longueur d'onde de 794.7 nm. Pour ce faire nous avons utilisé un spectromètre optique AvaSpec-3648 de marque AVANTES. Le logiciel associé nous a permis de déterminer les températures des Peltiers adéquates et la largeur de raie en fonction de la longueur d'onde pour chaque puissance étudiée (20, 22, 24, 26, 28, et 30 W). En faisant varier la puissance d'une diode puis de l'autre le calibrage s'est effectué en fixant la longueur d'onde à 794.7 nm et en faisant varier la température des Peltiers jusqu'à obtenir l'intensité la plus forte (en nombre de coups) sur la courbe du logiciel associé (Table 3-1).

Puissance (W)	T1 (°C)	T2 (°C)
20	20.5	14.5
22	19.0	14.0
24	17.5	13.5
26	16.5	13.0
28	15.5	11.5
30	15.0	09.5

Table 3-1 : Calibration des diodes lasers pour un maximum d'émission à 794.7 nm. Puissance=puissance émise à 794.7 nm. T1 est la température de consigne de la diode D1 et T2 est celle de la diode D2.

A 30 W, l'intensité maximale à 794.7 nm est obtenue pour une température de 15°C pour la première diode 1 (D1) et de 9.5 °C pour la seconde diode (D2). Dans la figure 3-12 se

trouve la courbe du spectre d'émission des diodes laser obtenu à 2 x 30 W qui sera la puissance de référence utilisée au cours de nos expériences.

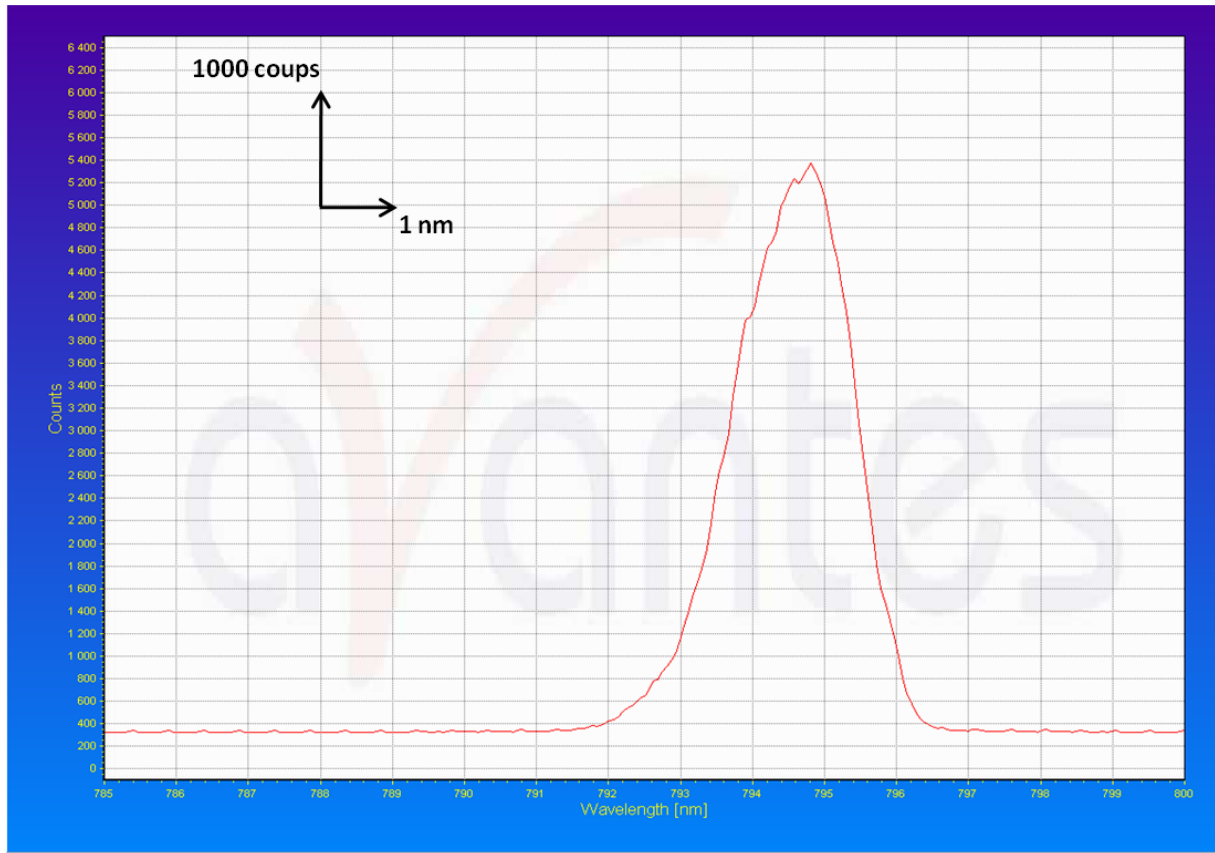


Figure 3-12 : Profil d'émission des diodes laser D1 et D2 (PD1=30 W, PD2=30 W, T1=15 °C et T2=9,5 °C).

La largeur de raie mesurée à mi-hauteur est de 2 nm, conforme aux données constructeur. A titre de comparaison, le spectre obtenu avec le laser Titane:Saphir du premier montage est donné en figure 3-13.

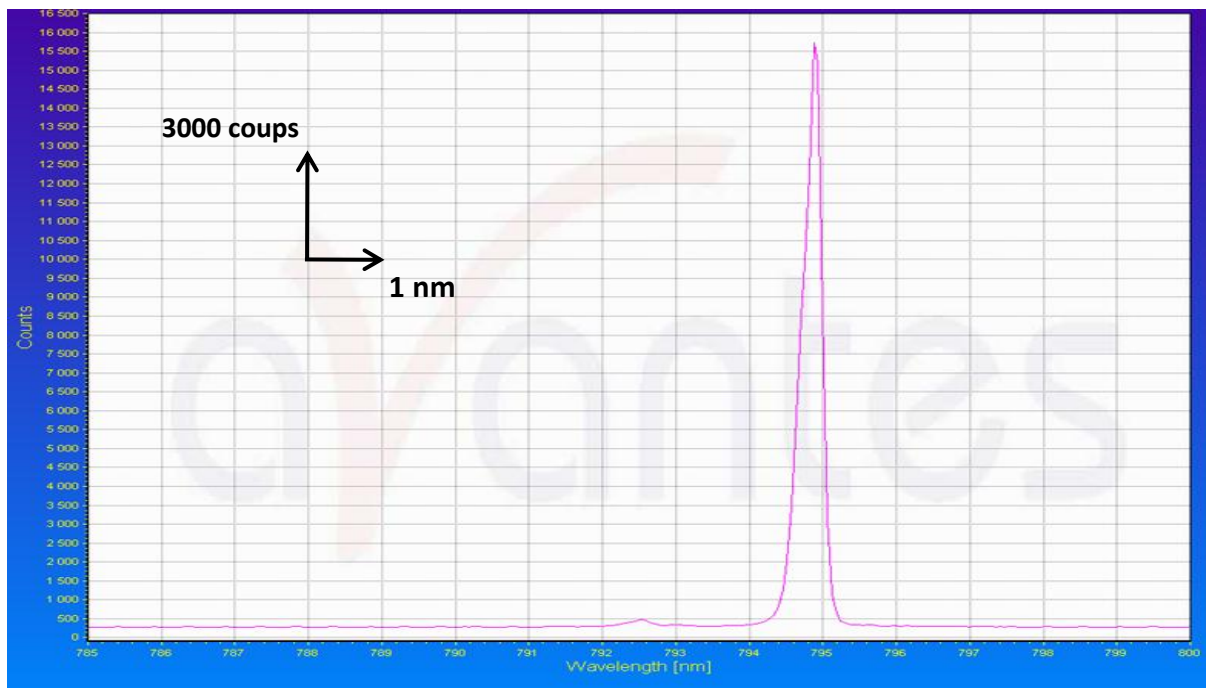


Figure 3-13 : Spectre d'émission du laser Titane:Saphir du montage 1 (P=6 W).

En mettant en parallèle l'ensemble de ces données nous pouvons comparer les largeurs spectrales des raies des 2 montages. Avec le premier montage à base de lasers nous obtenons une largeur de raie de 0.34 nm (Figure 3-13) contre 2 nm pour le second montage à base de diodes (Figure 3-12). Cela change évidemment les conditions expérimentales pour un pompage optique optimisé.

3.5.2.2. Cellule de pompage

La cellule de ce deuxième montage est similaire à celle du premier. Egalement en pyrex, elle est de forme cylindrique, possède un diamètre interne de 30 mm et mesure 115 mm de longueur. Son volume est de 81 ml et elle peut supporter des pressions totales allant jusqu'à la dizaine de bar. Son enveloppe externe (cylindre extérieur de 60 mm de diamètre et 160 mm de longueur) lui permet d'être chauffée jusqu'à 473 K grâce au passage d'un flux d'azote chaud (résistance chauffante de marque B-VT 2000, récupérée sur un spectromètre RMN). Pour accélérer encore le chauffage, un ruban chauffant est enroulé autour de la cellule. La face avant de la cellule de pompage est un verre traité de façon à ne pas absorber

la longueur d'onde de 794.7 nm afin de minimiser les pertes de faisceau au sein de la cellule de pompage contenant les différents gaz à polariser. Il est tenu par deux disques de Teflon (Figure 3-14).

La cellule se trouve au centre de 4 bobines concentriques (les 2 extérieures sont de diamètre 440 mm et 2 centrales de 620 cm de diamètre). Alimentées électriquement à 8 A et 112 V (alimentation en continue de marque Delta Electronika), celles-ci produisent un champ magnétique de 10 mT dont l'axe est parallèle au faisceau. L' intervalle moyen entre chaque bobine est de 25 cm (épaisseur de 7 cm pour chacune). L'homogénéité du champ magnétique délivré par ces bobines est supérieure à 10^{-4} sur un volume de 120 cm^3 .

Le remplissage de la cellule s'effectue dans des proportions où le xénon est minoritaire, l'hélium largement majoritaire et l'azote en quantité intermédiaire. De la même manière que pour le montage 1, un circuit d'arrivée et de sortie de gaz permet d'acheminer les différents gaz dans la cellule de pompage et d'en extraire le xénon hyperpolarisé. La différence ici est que le circuit en amont de la cellule est en métal tandis que l'aval est en pyrex. Le tout est conditionné de façon à résister aux hautes pressions dont il est question dans ce type de montage. Les raccords, les connections et l'ensemble du circuit sont renforcés. Néanmoins ici réside une faiblesse de ce montage parfois sujet à des problèmes d'étanchéité à long terme venant de la fragilité des raccords de type verre-plastique-métal (à l'entrée de la cellule) et verre-plastique-verre (en sortie de la cellule).

De nouveau (comme pour le montage 1) le verre de la cellule doit être particulièrement traité avec une solution piranha puis Surfasil à 10% pour s'affranchir de tout élément paramagnétique.

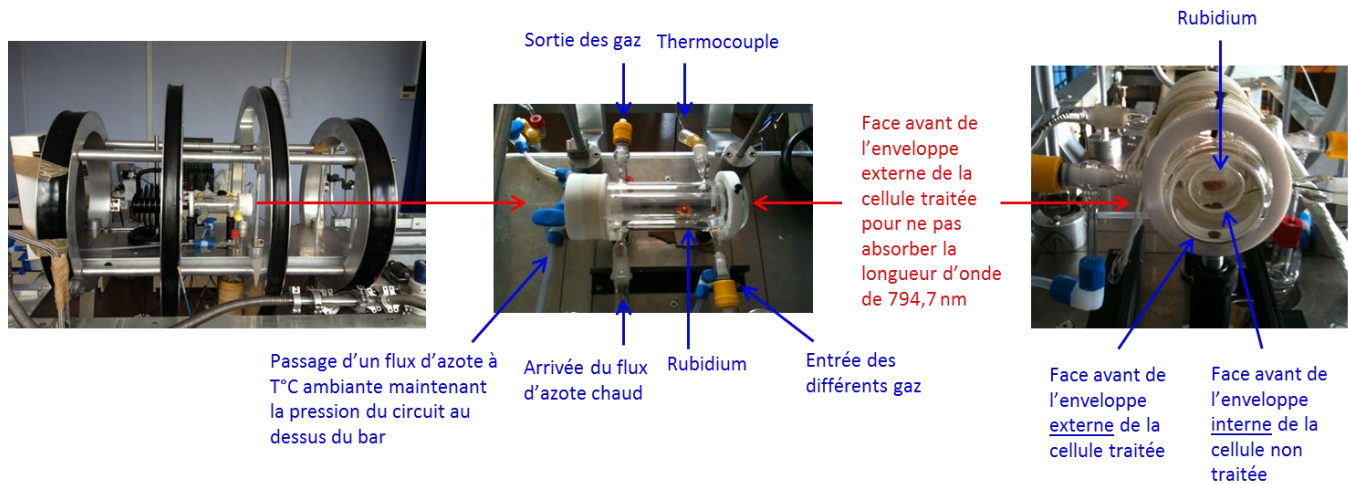


Figure 3-14 : Photos de la cellule de pompage optique du montage 2.

À l'arrière de la cellule est disposé un wattmètre (Coherent LM-100 HTD, avec afficheur Field Master-GS) qui mesure la puissance du faisceau en sortie du montage et indique indirectement l'efficacité de la polarisation du Rb. Pour le moment la puissance relevée au niveau du wattmètre est de 6 W à la sortie de la cellule de pompage (contre 30 W en entrée). Tous les photons n'atteignent pas le wattmètre, ceci ne signifie donc pas que seuls 6 W sont obtenus en sortie de la cellule de pompage (dépend notamment de l'inclinaison des faisceaux). Des ajustements peuvent encore être faits en ce qui concerne l'alignement des faisceaux et le positionnement de la cellule afin d'éviter au maximum les zones d'ombres et de maximiser le rendement de polarisation du montage.

3.5.2.3. Conditions de pompage optique

Pour obtenir une bonne polarisation du xénon, il faut d'abord une bonne polarisation du rubidium. La quantité de rubidium utilisée est de l'ordre du gramme. Or comme tous les alcalins le rubidium réagit très violemment en présence d'oxygène, il est donc primordial de garantir un bon vide dans l'ensemble du circuit arrivant et sortant de la cellule. Une pompe primaire assure à cet effet un vide de l'ordre de 10^{-5} bar à l'intérieur de la cellule et dans l'ensemble du circuit du montage. Une fois remplie avec le rubidium, le xénon 129 (pendant

cette thèse la majorité des études ont été réalisées avec du xénon enrichi à 86 % en isotope 129), l'azote (évitant les désexcitations radiatives), et l'hélium 4 (assurant la pression nécessaire à l'élargissement de la raie d'absorption du rubidium), la cellule est chauffée à une température optimale en fonction de la pression totale établie dans la cellule et le pompage optique peut débuter.

3.5.2.4. Collecte du xénon hyperpolarisé

Une fois le pompage optique terminé et le xénon hyperpolarisé au sein du mélange de gaz contenu dans la cellule, l'enjeu est de pouvoir le séparer des différents gaz, de le collecter, le stocker et enfin de pouvoir l'apporter jusqu'au spectromètre.

A la fin du pompage optique, la cellule est refroidie en éteignant la résistance chauffante et le ruban chauffant pour que le rubidium retourne à l'état solide et reste à l'intérieur de la cellule. A la sortie de la cellule se trouve un premier réservoir refroidi par un mélange « azote liquide-méthanol » à 175K qui a pour fonction de piéger les éventuelles vapeurs de rubidium qui auraient réussi à s'échapper de la cellule. Tout le long de la partie reliant la sortie de la cellule à la pompe d'évacuation en passant par le serpentin, le circuit est en surpression d'azote (~1.5 bar) pour : i) éviter une détente trop brutale, entre la cellule à haute pression et le reste du circuit, qui pourrait entraîner une relaxation par diffusion dans des gradients de champ trop efficace (voir plus loin) et ii) prévenir les fuites et donc l'entrée d'oxygène dans le montage. Pour piéger le xénon à la sortie de la cellule, le serpentin qui sert de réservoir de stockage est plongé dans un bain d'azote liquide à 77K. A cette température, le xénon est condensé (condensation à partir de 163K) et l'azote et l'hélium qui restent à l'état gazeux sont évacués par la pompe à vide. Le doigt froid de stockage du xénon hyperpolarisé a été dessiné sous forme de serpentin pour maximiser la surface de contact avec l'azote liquide et donc piéger plus de xénon. Il sert également à supporter le passage des hautes pressions et des plus grandes quantités de xénon à condenser et stocker. Contrairement au premier montage où les jonctions entre le doigt froid et le circuit de verre étaient juste emboîtées à l'aide de joints pour garantir l'étanchéité du système, ici le serpentin est vissé pour éviter d'être éjecté du reste du montage lors du

passage des hautes pressions. Pour conserver la polarisation du xénon, le serpentin est mis au centre d'un solénoïde délivrant un champ de 300 mT. Le tout (serpentin + solénoïde) est disposé dans un Dewar contenant l'azote liquide. La cellule de pompage est vidée en quelques secondes et c'est également le temps nécessaire à la condensation et au stockage du xénon fraîchement polarisé dans le serpentin. Une fois le gaz rare condensé dans le serpentin, le T_1 du xénon en phase solide est de plusieurs heures grâce au champ fourni par le solénoïde.

3.5.2.5. Déroulement d'une expérience de production de xénon hyperpolarisé et mesure de sa polarisation

Pour chaque pompage optique et mesure de polarisation sur un échantillon de ^{129}Xe hyperpolarisé, une expérience se déroule de la façon suivante :

- Etablissement du vide dans le circuit
- Remplissage de la cellule de pompage avec le mélange de gaz (xénon, puis azote, puis hélium)
- Chauffage de la cellule à la température choisie
- Etablissement d'une pression supérieure à 1 bar d'azote (de l'ordre de 1,5 bar en moyenne) dans le circuit entre la sortie de la cellule et la pompe à vide
- Une fois la température atteinte, déclenchement du champ magnétique entourant la cellule
- Chronométrage du temps de pompage
- Pendant le pompage, insertion du Dewar contenant le solénoïde et le bain d'azote liquide autour du serpentin.
- Une fois le pompage terminé, réalisation du premier transfert : la cellule est ouverte et la pompe à vide enclenchée : le xénon est stocké sous forme solide dans le serpentin et les autres gaz évacués par la pompe à vide.

- Lorsque le xénon est stocké dans le serpentin, les vannes permettant les entrées sorties des gaz sont fermées et les bouchons établissant le raccord avec le reste du montage sont dévissés pendant que le montage est isolé de l'air de la pièce grâce à des vannes Swagelok avant que soit désolidarisé le serpentin du montage.
- Le Dewar est alors décroché de son support (bâti sur lequel repose les bobines et le montage) et le chariot contenant le serpentin, le solénoïde plongé dans l'azote liquide et la batterie, est amené jusqu'au spectromètre.
- Le transfert de xénon entre le serpentin et un tube RMN sous vide est effectué à quelque centimètre de l'aimant du spectromètre, dans un champ de fuite d'une centaine de gauss. Le transfert du xénon réchauffé et sous forme gaz est permis par un pont de verre qui est relié à une pompe qui établit le vide entre les deux embouts des 2 tubes (du tube RMN et du serpentin). Ainsi le xénon se condense en passant du serpentin (qui est réchauffé à l'eau chaude) au tube RMN qui est refroidi par un point froid à l'azote liquide. Le tube RMN est alors introduit dans le spectromètre et l'expérience RMN peut commencer.

La méthode par laquelle sont obtenus les résultats de polarisation consiste dans un premier temps à comparer l'intégrale du signal RMN avec celui de la mesure à l'équilibre de Boltzmann du même échantillon (en utilisant la même sonde et en tenant compte du nombre de scans et du gain de réception). Ensuite l'aimantation de chaque autre échantillon est obtenue par comparaison des intégrales du signal xénon (conservant les mêmes contraintes expérimentales que précédemment). Pour accéder alors à une information de polarisation on divise la valeur d'aimantation (\mathcal{M}) obtenue par la masse (m) de xénon utilisée. En effet, une fois l'expérience RMN faite, le tube est pesé (pour connaître la masse de xénon transférée), puis la pression à l'intérieur du tube est estimée par une détente dans une ligne à vide de volume connu. Il s'agit juste d'une précaution : la figure 3-15 montre la bonne corrélation entre les 2 paramètres. Tout écart à cette droite ne traduit que la présence d'azote et/ou d'hélium en plus du xénon dans le tube RMN.

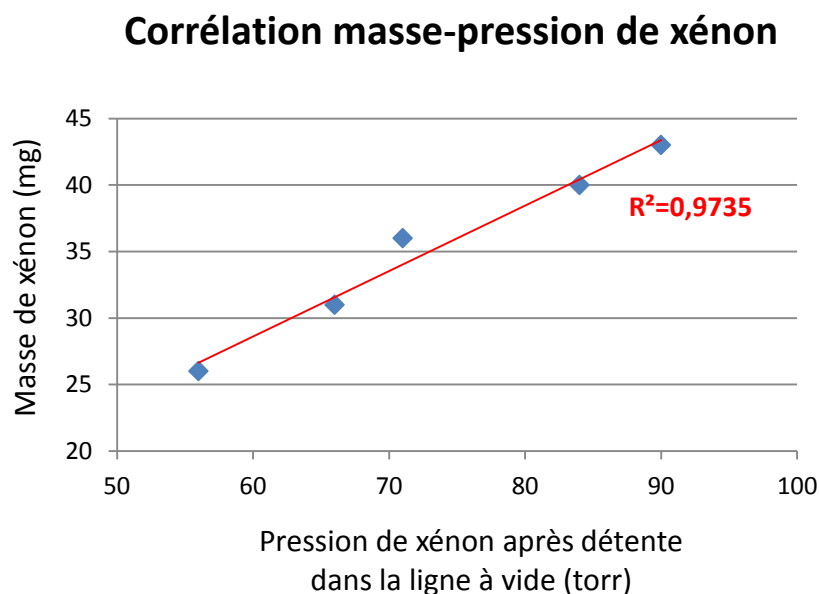


Figure 3-15 : Rapport entre la masse et la pression après détente du tube RMN dans la ligne à vide (il faut multiplier par 54.2 pour avoir la pression dans le tube RMN).

3.5.3. Résultats d'hyperpolarisation et discussion

Après que nous nous sommes assurés du bon fonctionnement technique du montage, plusieurs expériences faisant varier la composition en gaz, la pression totale, le temps de pompage et la température de la cellule ont été réalisées pour déterminer les conditions optimales de pompage optique.

Cependant disposant de mesure directe ni de la polarisation du rubidium ni de la polarisation du xénon dans la cellule de pompage, les paramètres expérimentaux permettant d'optimiser l'hyperpolarisation du xénon ont été obtenus après mesure de la polarisation du xénon dans le spectromètre RMN. Il s'agit donc d'une mesure très indirecte et sujette à de nombreuses imprécisions. Ces expériences nous ont cependant paru importantes pour dégager des tendances, tenter de comprendre ce qui se passe pendant le pompage optique et optimiser cette étape.

Les paramètres que nous souhaitons optimiser sont le temps de pompage, la quantité de xénon, la pression totale et la température dans la cellule. Ceux-ci ne sont malheureusement pas indépendants les uns des autres. Côté temps de pompage, il nous est rapidement apparu que 5 minutes était un temps suffisant pour produire le xénon polarisé. Ce temps peut certainement être raccourci (des expériences à 2 minutes de pompage optique n'ont pas révélé de performances significativement différentes), mais il représente une bonne valeur nous laissant le temps de préparer tout ce qui concerne le transfert du xénon jusqu'au tube RMN et l'expérience RMN elle-même.

3.5.3.1. Pression de xénon dans la cellule

Des expériences à même température, même temps de pompage optique et mêmes pressions d'azote et d'hélium ont été réalisées en ne faisant varier que la pression de xénon. Les résultats sont donnés en Table 3-2 et Figure 3-16.

P_{Xe}	Δ_{abs}	\mathcal{M}	m	D	Polar
(torr)	(W)		(mg)	(torr)	(%)
11	1,8	28,95	3	11,1	10,3
30	1,3	146,25	8,2	n.m.	19,0
79	0,8	452	21,8	100	22,1
125	0,6	1000	61,3	130	17,4

Table 3-2 : Résultats de polarisation du xénon 129 en fonction de la pression de xénon dans la cellule de pompage à 410 K, 320 torr d'azote, 3.5 bar d' ^4He et un temps de pompage égal à 5 min. P_{Xe} est la pression de xénon dans la cellule, Δ_{abs} la différence d'absorption mesurée au wattmètre champ magnétique allumé – champ magnétique éteint, \mathcal{M} l'aimantation ou plutôt le signal intégré sur un simple spectre, en corrigeant du gain de réception, m le résultat de la pesée du tube RMN, D la détente après expérience dans un volume sous vide connu, et Polar la polarisation du xénon.

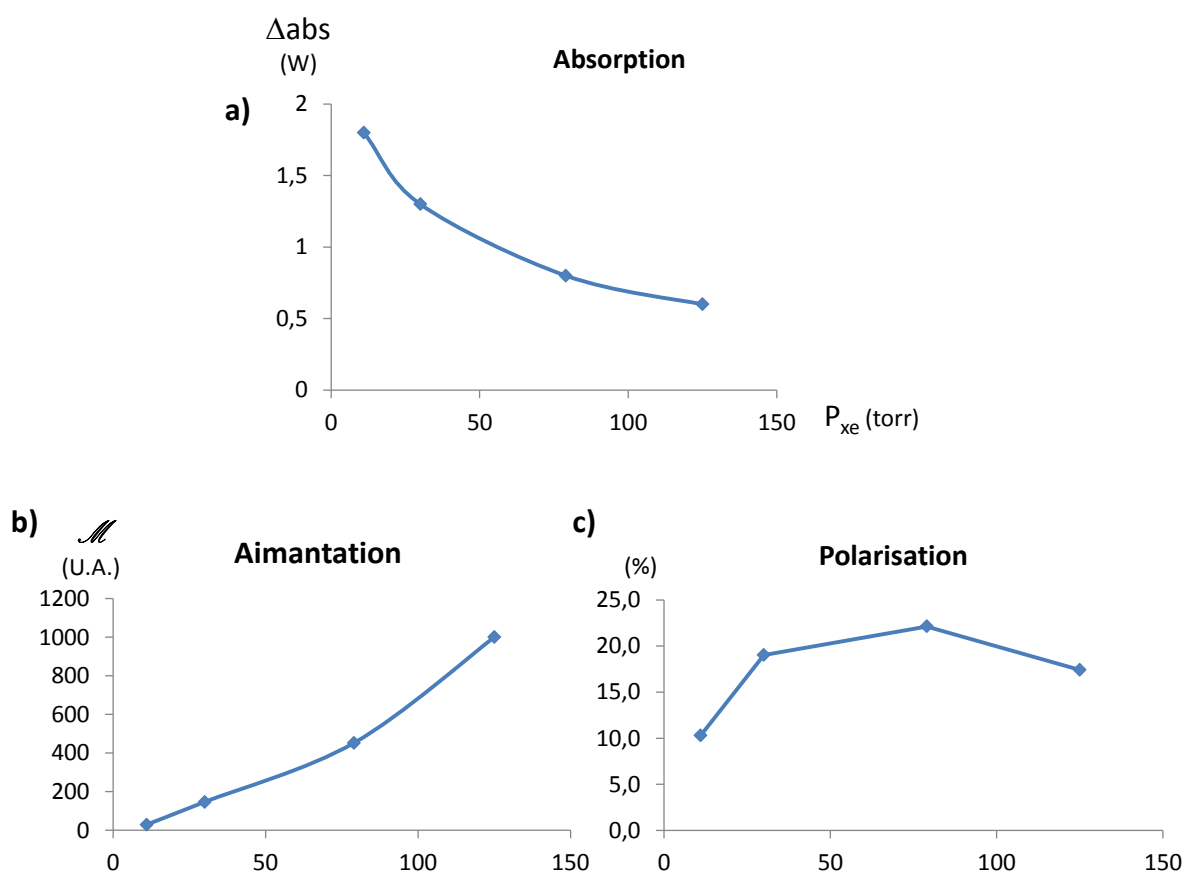


Figure 3-16 : Evolution de a) la différence d'absorption (champ ON – champ OFF), b) de l'aimantation et c) de la polarisation du xénon en fonction de la pression de xénon dans la cellule.

Il est tout d'abord à remarquer que Δ_{abs} décroît régulièrement avec la quantité de xénon dans la cellule. Ceci indubitablement traduit l'augmentation de la relaxation électronique du rubidium induite par les collisions avec les atomes de gaz rare (voir partie Modélisation). Ensuite, on observe que l'aimantation recueillie croît presque linéairement avec cette quantité de xénon, ce qui n'est pas étonnant mais prouve que la polarisation est maintenue dans toute cette gamme de pression, ce qui est confirmé par la courbe représentant la polarisation. Il semble toutefois que le maximum de polarisation soit obtenu entre 60 et 120 torr de xénon. Plus étonnant est le point à plus faible pression de xénon qui ne fournit pas une bonne polarisation, contrairement à ce qu'on aurait attendu (ceci a été observé plusieurs fois).

Quoi qu'il en soit cette étude prouve que l'on est capable de produire en quelques minutes 0,5 mmole ou 12 mL de xénon avec une polarisation voisine de 25%.

3.5.3.2. Pression totale dans la cellule

Des expériences à même température, même temps de pompage optique et même rapport de pression Xe/N₂ ont été réalisées en ne faisant varier que la pression d'hélium. Avec ce montage, des pressions allant jusqu'à environ 8 bar (mesuré à température ambiante) ont pu être utilisées.

Les résultats sont donnés dans la Table 3-3 en Figure 3-17.

P_{tot}	Δ_{abs}	m	D	Polar
<i>(bar)</i>	<i>(W)</i>	<i>(mg)</i>	<i>(torr)</i>	<i>(%)</i>
2.9	0.45	36	66	8
5.1	0.34	35	75	7.1
7.8	0.01	31	65	0.4

Table 3-3. Résultats de polarisation du xénon 129 en fonction de la pression totale dans la cellule de pompage à 393 K pour une pression de 85 torr de xénon et 300 torr d'azote et un temps de pompage égal à 5 min. Les pressions sont mesurées à température ambiante.

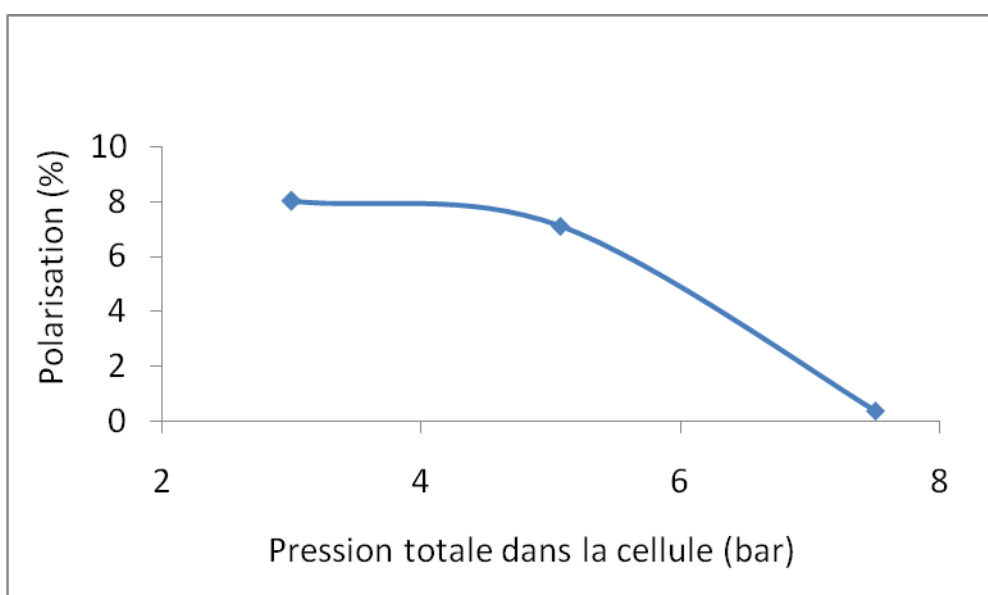


Figure 3-17 : Polarisation du xénon en fonction de la pression dans la cellule de pompage.

La pression totale qui semble donner les meilleurs résultats est 3 bar. Dans ces conditions, une polarisation de 8% est atteinte. Cette valeur est plus faible que lors des expériences de la Table 3-2, simplement car l'état de surface du rubidium était différent; cependant ces expériences ont toutes été faites le même jour, ce qui permet leur comparaison (c'est le cas pour toutes les séries d'expériences). Cette valeur de pression est un minimum en dessous duquel la pression serait trop faible pour permettre l'élargissement de raie requis pour une absorption optique optimale. Les expériences faites aux pressions comprises entre 5 et 8 bar montrent cependant une diminution de la polarisation (0,4 % de polarisation à 7,5 bar). Ce phénomène pourrait être due à la température de la cellule de pompage. En effet, au cours de nos expériences nous avons été confrontés à un problème de chauffage de la cellule de pompage optique. Celui-ci est assuré par 3 composantes : la résistance chauffante (par le flux continu d'azote chaud envoyé autour du cylindre interne de la cellule), le ruban chauffant enroulé autour de la cellule de pompage et le faisceau laser. Expérimentalement, nous avons constaté qu'en augmentant la pression totale à l'intérieur de la cellule, une température supérieure à 400 K était difficilement atteignable. Les causes peuvent être diverses. Cela peut être dû à un gradient de température favorisé par 2 éléments. Effectivement, une partie de l'énergie apportée par le faisceau laser est absorbée par le verre de la face de l'enveloppe interne de la cellule de pompage car celle-ci n'est pas

traitée pour ne pas absorber la longueur d'onde de 794.7 nm (contrairement à celle de l'enveloppe externe). A ce niveau le verre absorbe donc une partie importante des photons ce qui se traduit par un échauffement local et par conséquent par un gradient de température. D'autre part, le gradient de température peut être également favorisé par les hautes pressions qui impliquent une densité atomique élevée rendant difficile le passage du faisceau laser (et de la chaleur associée) vers l'arrière de la cellule. Nous signalerons donc ici que la difficulté à atteindre la température de consigne pour des pressions élevées peut être un frein à notre recherche d'une aimantation optimale obtenue par unité de temps.

3.5.3.3. Température de la cellule

La température optimale au sein de la cellule de pompage a été le paramètre le plus délicat à établir. Pour une pression totale de la cellule de l'ordre de 3 bar, la gamme de température étudiée s'étend de 390 K à 420 K. En dessous de 400 K, la température est trop basse, nous nous retrouvons dans le cas où la densité en atomes de rubidium est insuffisante, ce qui rend non optimale l'absorption des photons. Au-delà de 415 K la polarisation moins élevée semble provenir d'une relaxation accrue du xénon par les atomes de rubidium (Table 3-4 et Figure 3-18).

Cependant le choix de toute température comprise entre 400 K et 415 K est surtout à moduler en fonction de la pression dans la cellule, du degré d'oxydation du rubidium, etc.

T	P_{Xe}	Δ_{abs}	m	D	Polar
(K)	(torr)	(W)	(mg)	(torr)	(%)
390	77	0,5	23,6	58,8	10,8
400	76	0,8	26,1	73	20,2
410	79	0,8	21,8	100	22,1
420	73	0,8	29	64	18,4

Table 3-4 : Résultats de polarisation du xénon 129 en fonction de la température de la cellule de pompage pour une pression de xénon comprise entre 73 et 79 torr, une pression totale de 3 bar et un temps de pompage égal à 5 min.

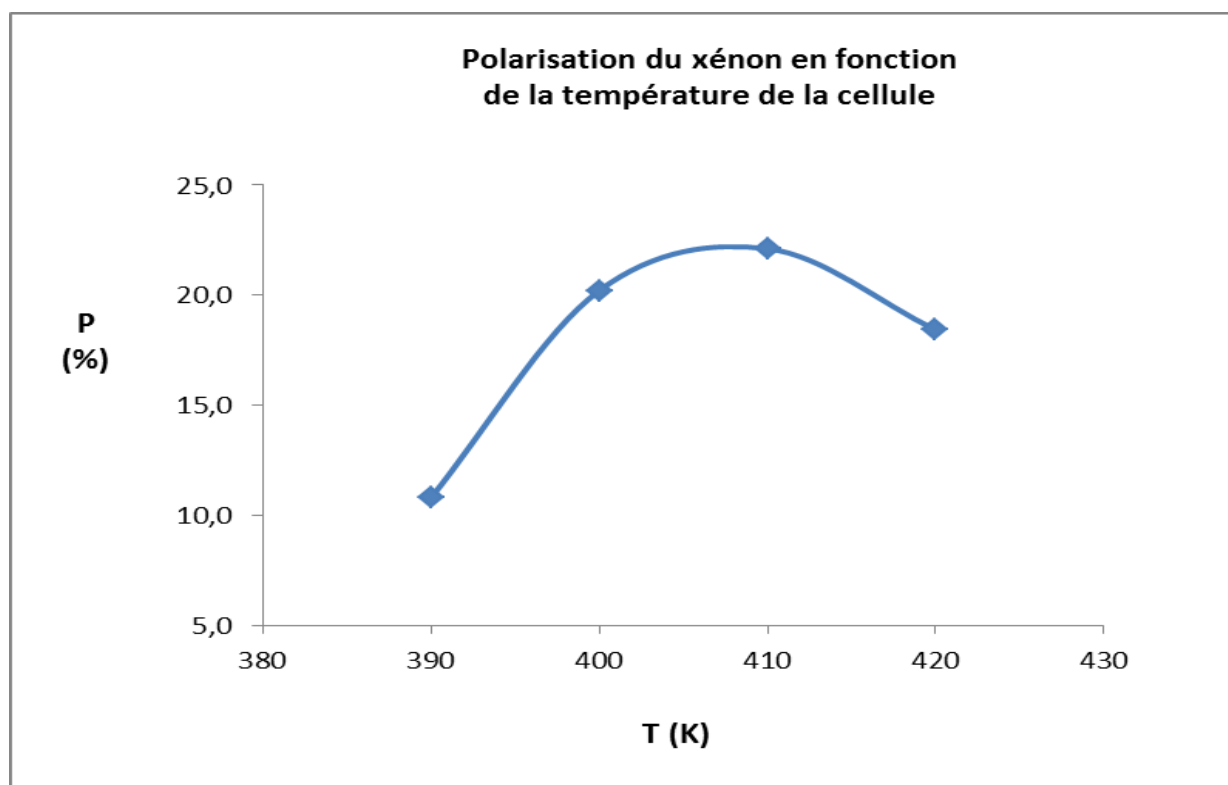


Figure 3-18 : Evolution de la polarisation du xénon (en %) en fonction de la température de la cellule de pompage, pour une pression de xénon d'environ 75 torr et une pression totale de 3 bar.

3.5.3.4. Etat de surface du rubidium

Nos expériences ont mis en évidence l'importance d'un facteur, jamais quantifié dans la littérature, et pourtant ayant un rôle prépondérant sur les résultats d'hyperpolarisation du xénon : l'état de surface du rubidium. En effet nous avons remarqué l'existence d'une grande variabilité des résultats d'hyperpolarisation directement liée à la différence d'absorption du rubidium (ce qui rend plus délicates les interprétations précédentes). La table 3-5 démontre qu'à quantité de xénon constante dans la cellule, la polarisation du xénon augmente avec la différence d'absorption du rubidium, Δ_{abs} , entre le moment où le champ magnétique est allumé et le moment où il est éteint. Il est clairement visible d'après la courbe de la figure 3-19 que plus la différence d'absorption du rubidium est grande, plus la polarisation du xénon obtenue est importante. La cause de la variabilité de cette valeur d'absorption est sans aucun doute due à l'état de surface du rubidium, qui est difficilement caractérisable.

P_{Xe}	P_{tot}	Δ_{abs}	\mathcal{M}	m	D	Polar
(torr)	(bar)	(W)		(mg)	(torr)	(%)
85	2,91	0,1	0,14	31	66	4,4
87	2,94	0,27	0,27	36	71	7,6
85	3,00	0,45	0,38	26	56	14,5
85	3,25	0,64	1,00	43	90	23,3

Table 3-5 : Polarisation obtenue après pompage optique de 5 minutes à 413 K avec 300 torr d'azote.

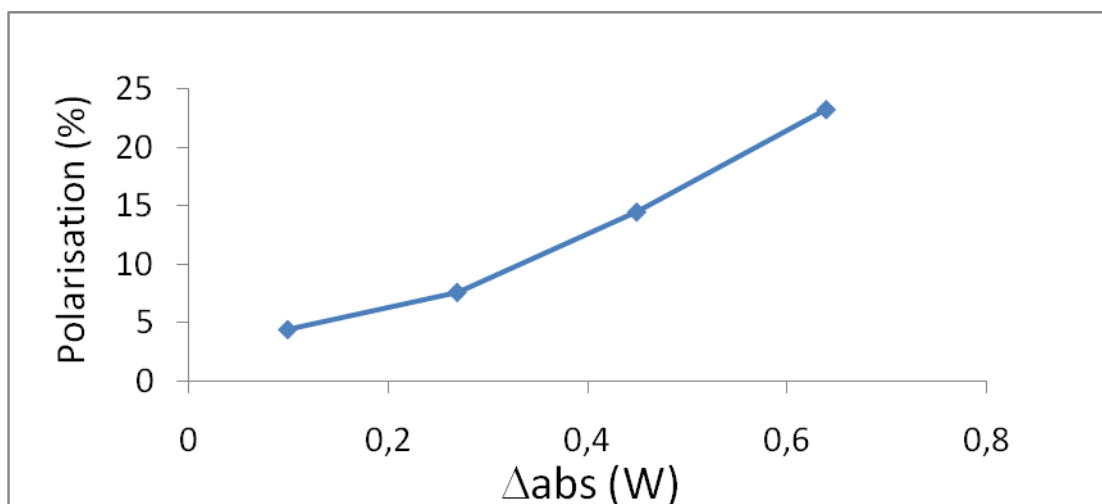


Figure 3-19 : Polarisation du xénon en fonction de la différence d'absorption du rubidium, (valeur relevée sur le wattmètre) champ magnétique allumé – champ magnétique éteint.

Ces études, bien que préliminaires, nous ont permis de constater que l'observation de la remontée de l'absorption du rubidium est un paramètre indirect mais très utile pour connaître la performance du pompage optique effectué.

Même si des études complémentaires sont nécessaires, l'optimisation des différents paramètres nous a permis de parvenir à une situation où nous pouvons produire une dizaine de millilitre de xénon avec une polarisation d'environ 25% en quelques minutes de pompage optique, ce qui nous place bien par rapport à la concurrence mondiale. Plusieurs voies nous sont ouvertes maintenant pour gagner encore en aimantation fournie par unité de temps, telles qu'affiner la largeur de raie fournie par les diodes et/ou modifier les volumes et géométrie de la cellule de pompage optique. Il reste aussi à travailler sur les possibilités d'accumulation du xénon hyperpolarisé.

3.5.4. Modélisation

Revenons quelque peu sur la théorie pour simuler ce qui se passe dans la cellule de pompage optique. Lorsqu'on s'intéresse à l'état fondamental et au premier état excité d'un alcalin plongé dans un champ magnétique faible (< 500 G) parallèle au faisceau lumineux d'excitation, les bons nombres quantiques sont $|F, m_F\rangle$ (Figure 3-20 : exemple pour le Rubidium).

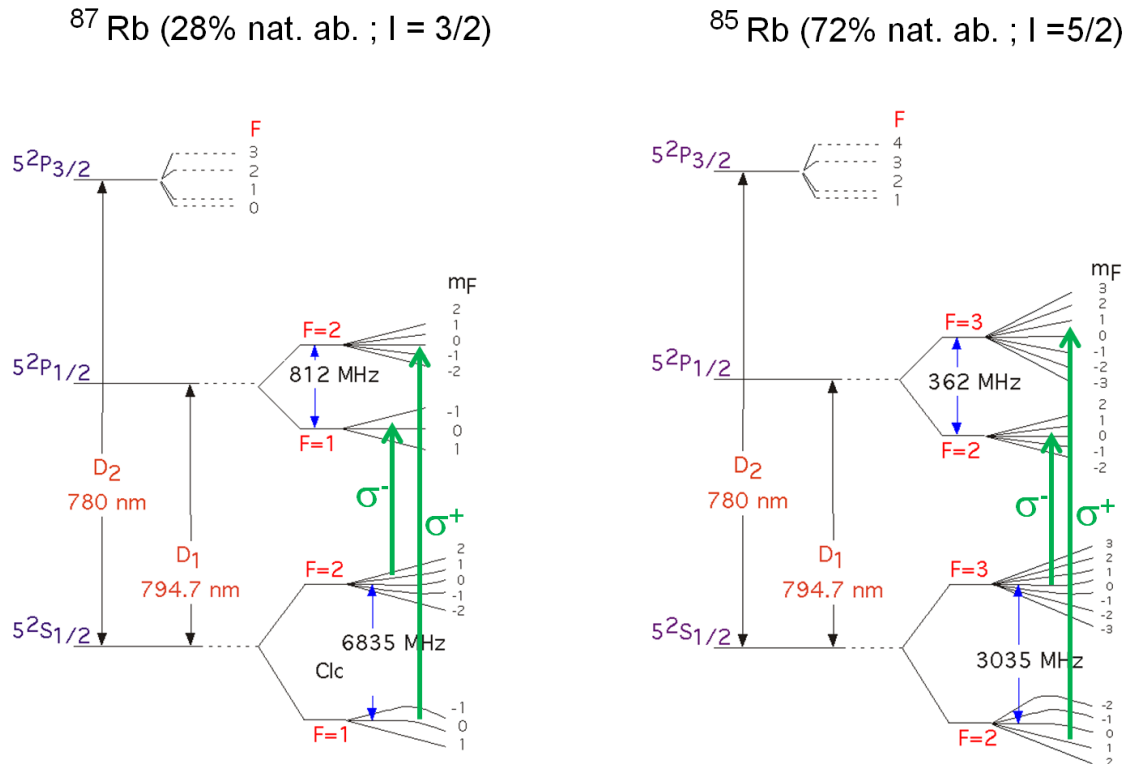


Figure 3.20 : Diagramme d'énergie des deux isotopes du rubidium (état fondamental et 2 premiers états excités). Les transitions σ^+ et σ^- sont représentées. F est le couplage hyperfin : $|I - J| \leq F \leq I + J$. Chaque niveau contient $2F+1$ valeurs de m_F .

L'élargissement par la pression étant de 18,6 GHz par amagat, la plupart du temps les niveaux hyperfins sont non résolus (3035 MHz \sim 3 GHz). On ne tiendra pas compte donc des niveaux m_F , d'autant plus que la largeur de raie de la source laser est bien supérieure à ces valeurs. Comme cela a déjà été dit, la méthode de pompage optique par échange de spin se décompose en 2 étapes : la première, une excitation par la lumière (passage du niveau $^2S_{1/2}$ vers $^2P_{1/2}$) de polarisation circulaire (spin +1 ou -1, flèches vertes) et un transfert subséquent de la polarisation photonique vers les niveaux m_F . Il s'agit d'un transfert optique,

donc très efficace. La seconde étape est un transfert partiel de la polarisation électronique de l'alcalin vers le spin nucléaire du xénon. C'est un transfert magnétique, donc qui représentera l'étape limitante.

Il nous faut donc tout d'abord considérer la concentration d'alcalin susceptible d'absorber le faisceau lumineux. A 140°C, d'après la courbe de pression de vapeur du rubidium en figure 3-21 il y a 3 mTorr de rubidium dans la cellule, ce qui correspond à $1,06 \cdot 10^{14}$ atomes par cm^3 .

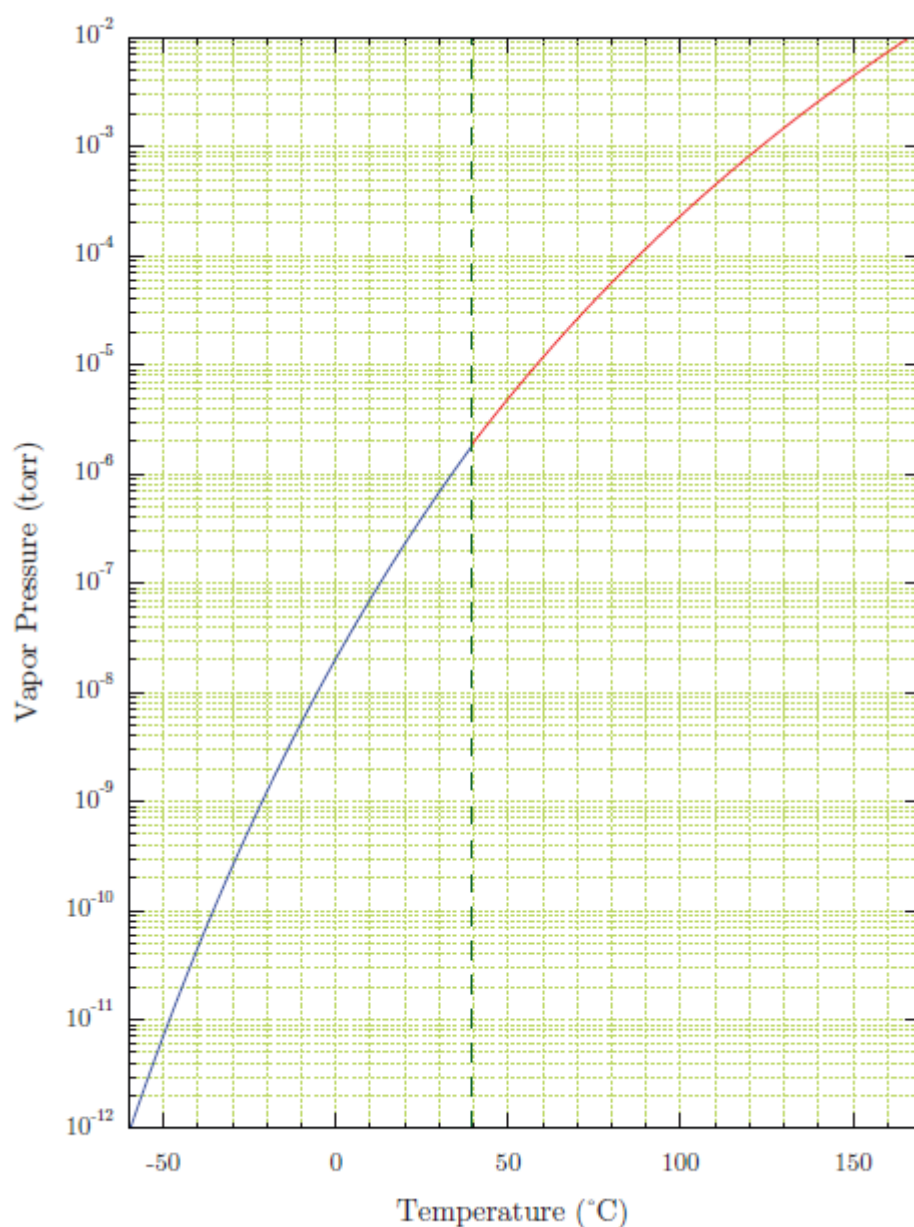


Figure 3-21 : Diagramme de pression de vapeur du rubidium.

Pompage optique :

La polarisation du rubidium est donnée par :

$$P_{Rb} = \frac{\gamma_{op}}{\gamma_{op} + \gamma_{sd}}$$

γ_{sd} est la vitesse de destruction de spin. γ_{op} , la vitesse de pompage optique par atome d'alcalin, est le paramètre le plus difficile à estimer :

$$\gamma_{op} = \int \Phi_P(r, z, \nu) \sigma_{abs}(\nu) d\nu$$

$\Phi_P = \Phi_E/h\nu$ (nombre de photons par seconde, relié à Φ_E la puissance du laser) serait facile à calculer en tenant compte de la largeur de raie émise par les diodes laser et en supposant une distribution gaussienne en longueur d'onde, mais la densité de photons est de toute façon dépendante de la coordonnée radiale (r) et longitudinale (z) dans la cellule. La section efficace d'absorption de la raie D1 de l'alcalin est estimée à partir des travaux de Chupp^{24,25} : $\sigma_{abs} = 10^{-12} \text{cm}^2$ à cette pression.

La vitesse de destruction de spin de l'alcalin avec les espèces M_i qu'il rencontre est donnée par :

$$\gamma_{sd} = \sum_i \kappa_{sd}^i [M_i]$$

avec κ_{sd}^i la vitesse de destruction de spin de l'alcalin pour l'espèce M_i .²⁶

Dans nos conditions standards de pompage optique, voici en Table 3-6 les vitesses de destruction de spin théoriques.

Rb-	P	[M _i]	κ_{sd}^i	γ_{sd}
(torr)	(torr)	(atomes.cm ⁻³)	(cm ³ .atome ⁻¹ .s ⁻¹)	(s ⁻¹)
He	2,3.10 ³	8,1.10 ¹⁹	2,0.10 ⁻¹⁸	1,6.10 ²
N ₂	2,3.10 ²	8,1.10 ¹⁸	9,0.10 ⁻¹⁸	7,3.10 ¹
Xe	3,0.10 ¹	1,1.10 ¹⁸	5,2.10 ⁻¹⁵	5,5.10 ³
Rb	3,0.10 ⁻³	1,1.10 ¹⁴	8,0.10 ⁻¹³	8,5.10 ¹
Total	2,5.10 ³	9,0.10 ¹⁹	8,1.10 ⁻¹³	5,8.10 ³

Table 3-6 : Vitesses de destruction de spin γ_{sd} du rubidium avec les différentes espèces mises en présence dans la cellule de pompage. La première colonne du tableau présente les espèces en interaction avec le rubidium, la seconde donne la pression en torr des espèces mises en jeu, la troisième le nombre d'atomes par cm³ pour chaque espèce. L'avant-dernière colonne représente les valeurs de κ_{sd}^i et la dernière la vitesse de destruction de spin du rubidium avec les espèces présentes dans la cellule, obtenue en multipliant les valeurs des 2 colonnes précédentes.

On remarque tout de suite d'après la Table 3-6 que la relaxation la plus violente se produit avec le xénon, ce qui explique qu'on ne peut pas trop augmenter la concentration de ce dernier sous peine de voir sa polarisation diminuer. Ces simulations conduisent à une polarisation du spin électronique du rubidium voisine de 1.

Echange de spin :

$$P_{Xe}(t) = \frac{\gamma_{se}}{\gamma_{se} + R_{1Xe}} P_{Rb} \left(1 - e^{-(\gamma_{se} + R_{1Xe})t} \right)$$

La vitesse d'échange de spin, dans le cas des collisions binaires (celui qui nous intéresse à pression > 1 atm), s'exprime par : $\gamma_{se} = [Rb] \langle \sigma_{se} v \rangle$, avec la section efficace d'échange de spin moyennée par la vitesse, $\langle \sigma_{se} v \rangle = 3,7 \pm 0,6 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$.²⁶

Donc $\gamma_{se} = 1,06 \cdot 10^{14} \times 3,7 \cdot 10^{-16} = 0,039 \text{ s}^{-1}$.

La relaxation du xénon se décompose comme suit :

$$R_{1Xe} = R_{1W} + R_{1DD} + R_{1SR} + R_{1diff} + R_{1autres}$$

- R_{1W} est la vitesse de relaxation avec les impuretés des parois. Pour la minimiser, un traitement à base de siloxanes des parois intérieures de la cellule est réalisé. On peut aussi minimiser le rapport surface/volume de la cellule de pompage, ce qui n'est pas toujours facile à faire. Une cellule de forme sphérique minimiserait ce rapport mais ne permettrait pas la meilleure transmission de la lumière dans la cellule.
- R_{1DD} est la relaxation du xénon avec les paramagnétiques (autres que contenus dans les parois), tels que O₂.
- R_{1SR} est la relaxation par spin-rotation. Elle est d'autant plus rapide que la température est élevée.
- R_{1diff} est la relaxation par diffusion dans un champ magnétique inhomogène. On minimise ce terme en prévoyant un champ magnétique de pompage très homogène (dans notre cas, $\Delta B_0/B_0 < 10^{-4}$).
- $R_{1autres}$: ce terme inclut la relaxation avec le xénon-131, etc.

Des valeurs de T₁ de l'ordre de 20 min dans des cellules traitées avec des siloxanes ont été mesurées.²⁰ Ces valeurs nous permettent d'accéder à la valeur de R_{1Xe} qui devient négligeable devant γ_{se} . Dans ces conditions idéales où l'on peut négliger les collisions avec les parois de la cellule, la courbe verte de la figure 3-22 est obtenue. Au contraire si le T₁ est plus court comme dans le cas des cellules non traitées et lorsque des températures élevées, dégradant le traitement à base de siloxane, sont utilisées, la polarisation maximale décroît sérieusement. La courbe bleue de la figure 3-22 représente une modélisation dans le cas où le T₁ xénon serait de 30 s.

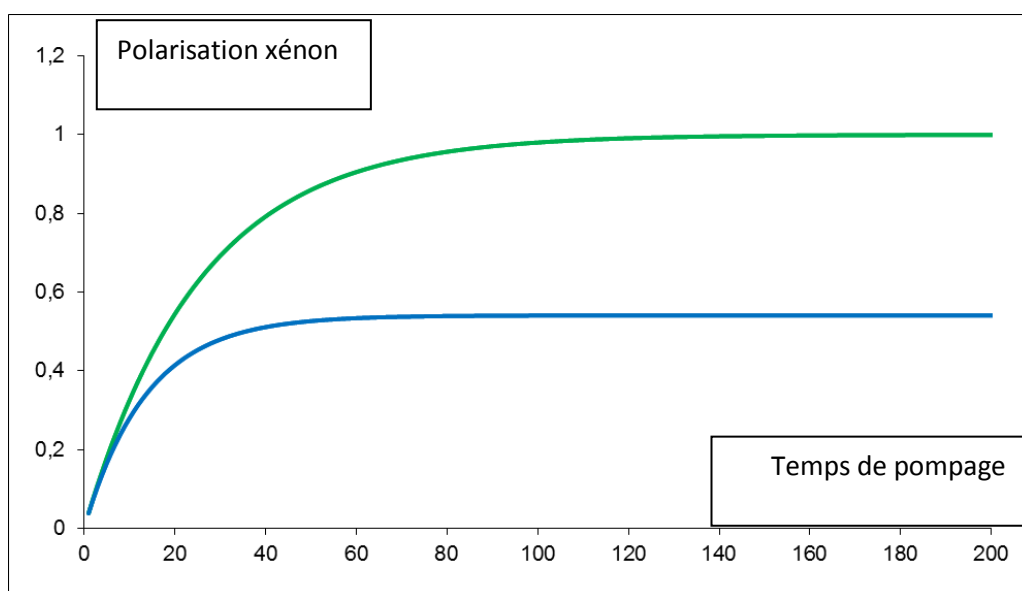


Figure 3-22 : Modélisation de la montée de polarisation xénon obtenue avec un T_1 xénon non considéré pour la courbe verte et pour un T_1 xénon de 30s pour la courbe bleue.

Il faut noter que si l'on souhaite privilégier la polarisation absolue du xénon, il faut prendre toutes les précautions pour ralentir la relaxation du xénon dans la cellule, mais qu'alors le temps pour atteindre la polarisation optimale est plus long. D'un autre côté si on ne s'intéresse qu'à l'aimantation globale (proportionnelle au produit polarisation x volume produit) par unité de temps cela ne vaudra pas forcément le coup de traiter les parois de la cellule par exemple, surtout qu'elle se détériore assez vite au cours du temps.

Si l'on considère l'efficacité de transfert rubidium/xénon, on arrive à une valeur

$$\eta = \frac{\langle \sigma_{se} v \rangle}{\kappa_{sd}^{Xe}} = 0,07$$

(7% des collisions Rb-Xe sont efficaces pour qu'il y ait transfert du spin électronique du rubidium vers le spin nucléaire du xénon, ou autrement dit il faut 14 photons pour polariser un noyau de xénon). Zeng et coll.²⁷ ont tabulé ces valeurs pour différents alcalins, et il s'avère que le césium est le plus avantageux pour polariser le xénon ($\eta = 0,31$). Sachant que sa pression de vapeur est plus élevée (à 140°C, il y aura 6 mTorr de césium dans la cellule, au lieu de 3 mTorr pour le rubidium), que la longueur d'onde de sa transition D1 est de 894 nm au lieu de 795 nm (délivrant donc plus de photons par watt) et qu'elle est plus éloignée de la

transition D2 (852 nm) on a tout intérêt à l'utiliser maintenant que des diodes de puissance existent à cette longueur d'onde.²⁸ C'est aussi une piste à suivre.

REFERENCES

- (1) Overhauser, A. *Phys. Rev.* **1953**, *89*, 689
- (2) Maly, T.; Debelouchina, G. T.; Bajaj, V. S.; Hu, K.-N.; Joo, C.-G.; Mak-Jurkauskas, M. L.; Sirigiri, J. R.; van der Wel, P. C. A.; Herzfeld, J.; Temkin, R. J.; Griffin, R. G. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
- (3) Song, C.; Hu, K.; Joo, C.; TM, S.; Griffin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *35*, 11385.
- (4) Hu, K.; Yu, H.; Swager, T.; Griffin, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10844.
- (5) Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Fridlund, B.; Gram, A.; Hansson, G.; Hansson, L.; Lerche, M. H.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2003**, *100*, 10158.
- (6) Comment, A.; Jannin, S.; Hyacinthe, J.; Mieville, P.; Sarkar, R.; Ahuja, P.; Vasos, P.; Montet, X.; Lazeyras, F.; Vallee, J.; Hautle, P.; Konter, J.; van den Brandt, B.; Ansermet, J.; Gruetter, R.; Bodenhausen, G. *Phys. Rev. Lett.* **2010**, *105*, 018104 1.
- (7) Bowers, C. R. In *Encyclopedia of NMR*; Grant, D. M., Harris, R. K., Eds.; Wiley: 2002; Vol. 9, p 750.
- (8) Kastler, A. *J. Phys. Radium* **1950**, *11*, 255.
- (9) Bouchiat, M. A.; Carver, T. R.; Varum, C. M. *Phys. Rev. Lett.* **1960**, *5*, 373.
- (10) Happer, W.; Miron, E.; Schaefer, S.; Schreiber, D.; van Wijngaarden, W. A.; Zeng, X. *Phys. Rev. A* **1984**, *29*, 3092.
- (11) Ruth, U.; Hof, T.; Schmidt, J.; Fick, D.; Jansch, H. *J. Appl. Phys. B* **1999**, *68*, 93.
- (12) Colegrove, F. D.; Scheerer, L. D.; Walters, G. K. *Phys. Rev.* **1963**, *132*, 2561.
- (13) Stoltz, E.; Meyerhoff, M.; Bigelow, N.; Leduc, M.; Nacher, P. J.; Tastevin, G. *Appl. Phys. B* **1996**, *63*, 629.
- (14) Nacher, P. J.; Leduc, M. *J. Phys.* **1985**, *46*, 2057.
- (15) Colegrove, F.; Franken, P. *Phys. Rev.* **1960**, *119*, 680.
- (16) Brunner, E. *Conc. Magn. Reson.* **1999**, *11*, 313.
- (17) Wagshul, M. E.; Chupp, T. E. *Phys. Rev. A* **1989**, *40*, 4447.
- (18) Happer, W. *Rev. Mod. Phys.* **1972**, *44*, 169.
- (19) Grover, B. C. *Phys. Rev. Lett.* **1978**, *40*, 391.
- (20) Zeng, X.; Miron, E.; Van Wijngaarden, W. A.; Schreiber, D.; Happer, W. *Phys. Lett. A* **1983**, *96*, 191.
- (21) Breeze, S. R.; Lang, S.; Moudrakovski, I.; Ratcliffe, C. I.; Ripmeester, J. A.; Santyr, G.; Simard, B.; Zuger, I. *J. Appl. Phys.* **2000**, *87*, 8013.
- (22) Berthault, P.; Huber, G.; Desvaux, H. *Prog. NMR Spectrosc.* **2009**, *55*, 35.
- (23) Mastromarino, P.; Otey, C.; Pripstein, D.; Hughes, E. W. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **2002**, *194*, 69.
- (24) Wagshul, M. E.; Chupp, T. E. *Phys. Rev. A* **1994**, *49*, 3854.
- (25) Chupp, T. E.; Wagshul, M. E.; Coulter, K. P.; McDonald, A. B.; Happer, W. *Phys. Rev. C* **1987**, *36*, 2244.
- (26) Driehuys, B.; Cates, G. D.; Miron, E.; Sauer, K.; Walter, D. K.; Happer, W. *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *69*, 1668.
- (27) Zeng, X.; Wu, Z.; Call, T.; Miron, E.; Schreiber, D.; Happer, W. *Phys. Rev. A* **1985**, *31*, 260.
- (28) Whiting, N.; Eschmann, N. A.; Goodson, B. M.; Barlow, M. J. *Phys. Rev. A* **2011**, *83*, 053428.

Chapitre 4

Séquences d'IRM adaptées aux espèces hyperpolarisées

Chapitre 4 - Les séquences d'IRM adaptées aux espèces hyperpolarisées

L'imagerie utilisant des espèces hyperpolarisées est différente de l'IRM classique par plusieurs aspects. La polarisation du noyau à imager étant hors équilibre, il est primordial d'en tenir compte pour l'élaboration des séquences d'impulsions. Ces espèces hyperpolarisées sont caractérisées par une aimantation qui décroît au cours du temps et qui est atténuée par chaque impulsion d'excitation. Dans un système fermé où seul un bolus de xénon est considéré, la polarisation revient totalement à l'équilibre défini par la distribution de Boltzmann après une seule impulsion 90° (égalisant les populations de spin), l'hyperpolarisation est perdue en une fois. A défaut d'avoir un apport continu en espèce hyperpolarisée, cet inconvénient peut être en partie compensé par des techniques de balayage rapide de l'espace des k et des méthodes de variations des angles d'impulsion. Ces séquences d'IRM, conçues dans l'optique de respecter le principe « use it or lose it » connu pour les espèces hyperpolarisées, permettent de balayer l'espace des k plus rapidement soit de façon cartésienne comme dans le cas des séquences FLASH, EPI et TRUE FISP, ou de façon non cartésienne comme pour les séquences radiale ou spirale. Notons aussi qu'une autre particularité de ces séquences est qu'évidemment entre deux acquisitions il n'est pas nécessaire d'attendre le retour à l'équilibre de l'aimantation ; au contraire il convient d'aller le plus vite possible pour bénéficier de l'hyperpolarisation hors équilibre. Enfin, particulièrement en ce qui concerne les gaz polarisés par pompage optique où le gain d'aimantation est drastique, des effets non linéaires peuvent apparaître, empêchant la manipulation simple des spins.

Les séquences d'écho de gradient sont généralement préférées aux séquences d'écho de spins, malgré les artefacts de déplacements chimiques et de susceptibilité magnétique auxquelles elles sont sujettes, car 1/ il peut être difficile d'inverser une aimantation intense,¹ 2/ si les bobines d'émission ne couvrent pas la totalité de la région hyperpolarisée (comme c'est très souvent le cas en micro-imagerie), on peut avoir, à cause de l'impulsion 180° , un mélange d'espèces hyperpolarisées 'up' et 'down'.

4.1. Projection-Reconstruction

La première technique historique d'imagerie est la technique de projection-reconstruction (PR) dans laquelle l'espace des k est balayé de façon sphérique. L'espace des k est rempli par une succession de rayons échantillonnés dont l'angle est déterminé par l'intensité relative des gradients x et y pendant l'acquisition du signal (Figure 4-1). Cette expérience permet de coder davantage de points au centre de l'espace des k (basses fréquences spatiales) qui déterminent l'essentiel des informations de contraste et de forme de l'image, mais elle conduit à un balayage non cartésien de l'espace des k . Lorsque l'on parvient à obtenir un champ et des gradients homogènes, ce procédé présente de nombreux avantages en comparaison avec les techniques de balayage cartésien de l'espace des k . Tout d'abord aucun gradient d'encodage de phase n'est utilisé, ce qui peut permettre un TE (délai entre l'impulsion r_f et le délai d'acquisition) plus court. Cette méthode peut être utilisée avec des gradients fixes, en faisant tourner l'échantillon. De plus, la méthode de projection-reconstruction a l'avantage d'être une méthode solide face aux artefacts de mouvement (issu d'un flux ou des mouvements dus à la respiration). Enfin les artefacts de repliement (aliasing) sont beaucoup plus atténués avec une telle technique.

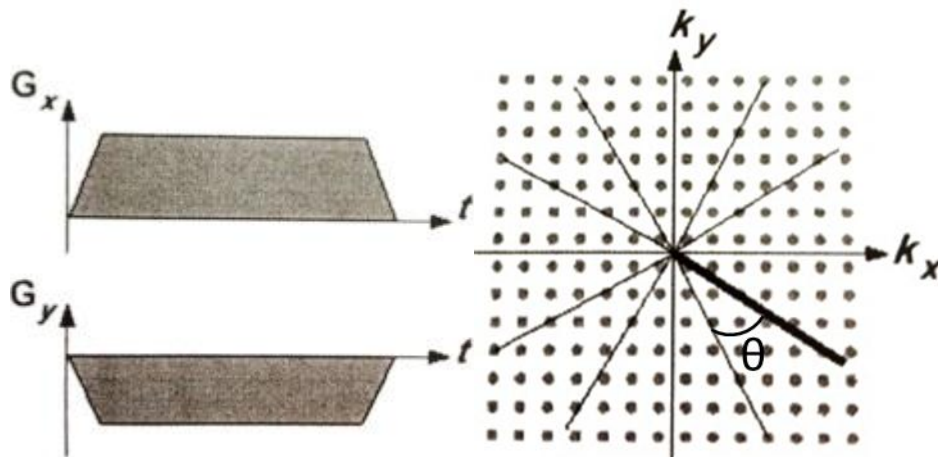


Figure 4-1 : Remplissage par projection-reconstruction de l'espace des k grâce aux gradients correspondants avec $\tan \theta = \frac{G_x}{G_y}$.

4.2. FLASH

La séquence FLASH (FastLow Angle SHot) est une séquence particulièrement adaptée aux espèces hyperpolarisées, et la plus simple pour un balayage cartésien rapide de l'espace réciproque.² L'utilisation répétitive de petits angles d'impulsion est d'un grand intérêt dans le cadre d'un système contenant un unique bolus de gaz polarisé non renouvelé, la composante transversale de l'aimantation étant détectable mais perdue après l'acquisition. Lors d'une séquence FLASH, chaque ligne de l'espace des k est parcourue en une seule acquisition à la suite d'une impulsion radiofréquence à un angle choisi. Il est possible de commencer la séquence par la ligne centrale de l'espace des k pour bénéficier au mieux de l'aimantation intense transitoire ; c'est le mode centrique d'acquisition (les gradients de phase évoluent en 0, $+G_{\min}$, $-G_{\min}$, ..., $+G_{\max}$, $-G_{\max}$).

Si \mathcal{M}_z est l'aimantation initiale, la perte d'aimantation suivant l'axe longitudinal z après n impulsions d'angle θ sera donnée par :

$$\mathcal{M}_z^n = \mathcal{M}_{0z} (\cos \theta)^n$$

Tandis que la composante dans le plan transversal (xy) qui est détectée sera (Figure 4-2) :

$$\mathcal{M}_{xy}^n = \mathcal{M}_{0z} (\cos \theta)^{n-1} \sin \theta$$

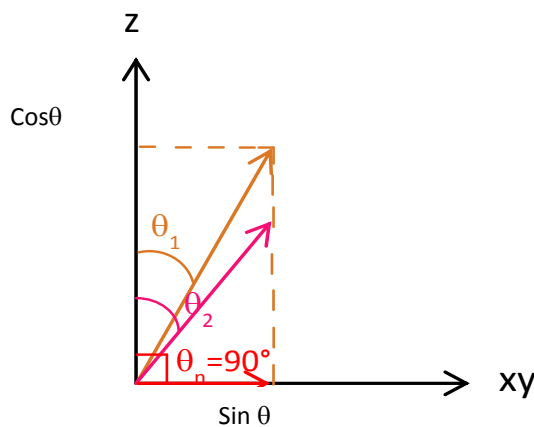


Figure 4-2 : Schéma de l'évolution de l'aimantation longitudinale et transversale en fonction de l'angle θ de basculement de l'aimantation par une impulsion rf.

Nous avons ici négligé le T_1 de l'espèce hyperpolarisée. Ceci est valable la plupart du temps pour le xénon, puisque le temps d'acquisition suite à une impulsion est de l'ordre de la milliseconde alors que le T_1 du xénon est plus long, de l'ordre de la dizaine de secondes dans le sang, de la centaine de secondes en milieu aqueux ($T_{1,D2O} \sim 500$ s) et plus encore en phase gaz (de l'ordre de quelques heures). L'inconvénient rencontré avec une séquence FLASH classique est donc la diminution progressive du signal pendant le balayage ligne à ligne de l'espace des k , du fait des impulsions et de la relaxation du xénon. La conséquence de cette perte continue de polarisation pendant l'acquisition d'une expérience d'IRM est un amoindrissement du signal le long de la dimension de phase, qui se traduit après transformation de Fourier par un flou ou manque de résolution sur l'image dans cette dimension (l'enveloppe du signal est multipliée par une exponentielle décroissante).

Pour corriger cette perte de signal entraînant la détérioration de la résolution spatiale effective de l'image, l'angle de l'impulsion d'excitation peut être progressivement augmenté au fur et à mesure que le bolus de gaz se dépolarise. En faisant varier cet angle, il sera donc possible de maintenir l'aimantation transversale constante. Ainsi, la séquence FLASH utilisant des impulsions à angles variables offre la possibilité de garder une aimantation constante tout au long de l'acquisition dans un système ne contenant qu'un bolus de gaz hyperpolarisé.³ L'angle variable utilisé pour une telle séquence est :

$$\theta^n = \arcsin\left(\frac{e^{(n-1)\frac{TR}{T_1}} \sin \theta_1}{\prod_{j=1}^{n-1} \cos \theta_j}\right)$$

Avec n le n ème pulse, TR le temps de répétition, T_1 le temps de relaxation du noyau dans le milieu étudié, θ_1 le premier angle de la séquence et θ^n le dernier. Le choix de θ de toutes les impulsions radio fréquence, dépendra du rapport TR/T_1 et du nombre de points que l'on souhaite avoir dans la dimension de phase. Plus l'angle est petit, plus le nombre de points dans la dimension de phase pourra être important. Les angles utilisés sont généralement choisis pour que le dernier angle appliqué soit égal à 90° de manière à exploiter totalement toute l'aimantation disponible. En plus de l'amélioration du rapport signal sur bruit, le profil de l'image obtenu avec une séquence FLASH à angle variable représente de façon beaucoup plus fidèle l'objet réel (par rapport à une FLASH classique).

4.3. TRUE FISP

Pour rentabiliser encore plus le signal provenant de l'hyperpolarisation, un recyclage de l'aimantation transversale après chaque acquisition peut être réalisé (la condition ici est que $T_2^* \gg TR$). Les expériences SSFP (Steady-State Free Precession), parmi lesquelles on trouvera la séquence TrueFast Imaging and Steady Precession (TrueFISP), sont utilisées pour les espèces hyperpolarisées et particulièrement pour le carbone 13.⁴⁵ Le principe d'une telle séquence repose sur le 'ré-embobinage' des gradients de phase dans le but de compenser le déplacement dans la dimension indirecte de l'espace des k.

Dans une expérience de TrueFISP une impulsion de pré-excitation assure qu'une pré-aimantation est obtenue dans les plus courts délais. Le schéma de cette séquence est décrit dans la figure 4-3.

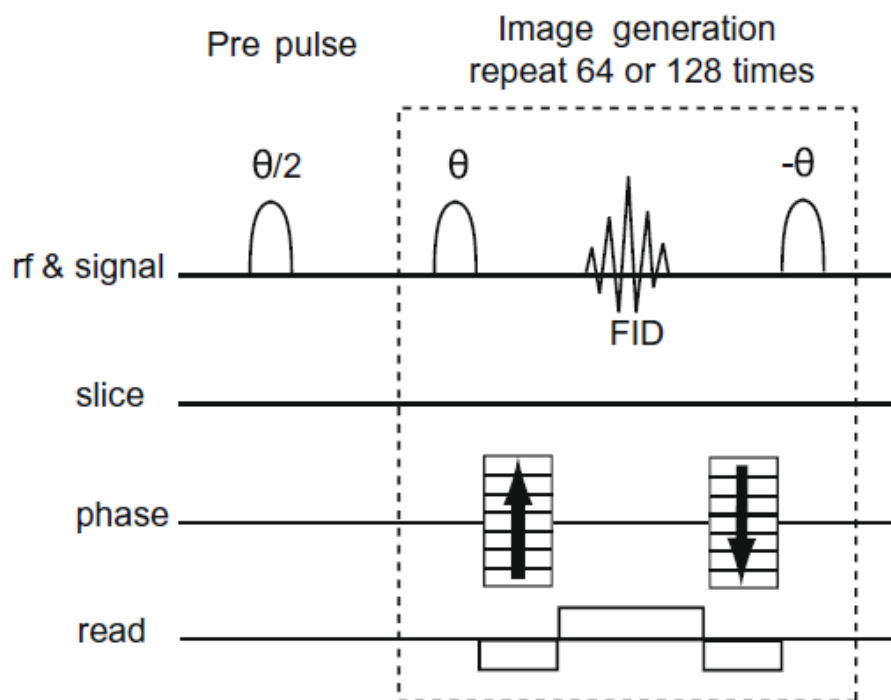


Figure 4-3 : Séquence TrueFISP. La partie hachurée représente la boucle d'encodage de phase. Pour les espèces hyperpolarisées ^{13}C $\theta=160^\circ$.⁵

La finalité d'une telle séquence est de pouvoir utiliser des impulsions d'excitation avec des angles de basculement plus importants que dans les séquences FLASH, ceci en

recyclant l'aimantation transverse qui diminue lentement. Un autre des points forts de cette séquence est qu'elle est moins sujette aux artéfacts de susceptibilité magnétique (dans les milieux où il existe de grande différence de susceptibilité (vascularisation, cerveau..., colonne vertébrale)) contrairement à l'EPI qui est bien plus sensible, et qu'elle peut donc dans ces cas fournir des images de bien plus grande qualité.⁶

4.4. Imagerie par Echo Planaire

Dans la méthode d'imagerie par écho planaire (Echo Planar Imaging), une seule impulsion d'excitation suffit à couvrir de façon continue sous la forme d'un train d'échos de gradient tout ou une grande partie de l'espace de Fourier. Cette technique d'imagerie est connue pour sa rapidité (mais également pour sa résolution spatiale limitée, lorsque la relaxation transversale n'est pas suffisamment lente).

Dans une séquence EPI, un gradient (G_x en bleu) est appliqué avec des alternances positives et négatives de façon à balayer les lignes horizontales de l'espace des k . Dans la méthode 'blip' décrite en figure 4-4, le gradient de phase (G_y en vert) est appliqué après chaque gradient de lecture G_x afin d'assurer le passage à la ligne suivante. L'espace des k est ainsi balayé de droite à gauche et inversement à chaque écho. Dans le cas où le gradient de phase est appliqué de façon continue, l'espace des k est balayé de façon diagonale puisque les gradients G_x et G_y s'additionnent.

Bien que très utile parce que très rapide, cette séquence reste néanmoins sujette à de nombreux artéfacts, liés à la susceptibilité magnétique, au déplacement chimique et surtout aux imperfections des gradients. Ces derniers artéfacts sont communs à l'imagerie spirale.

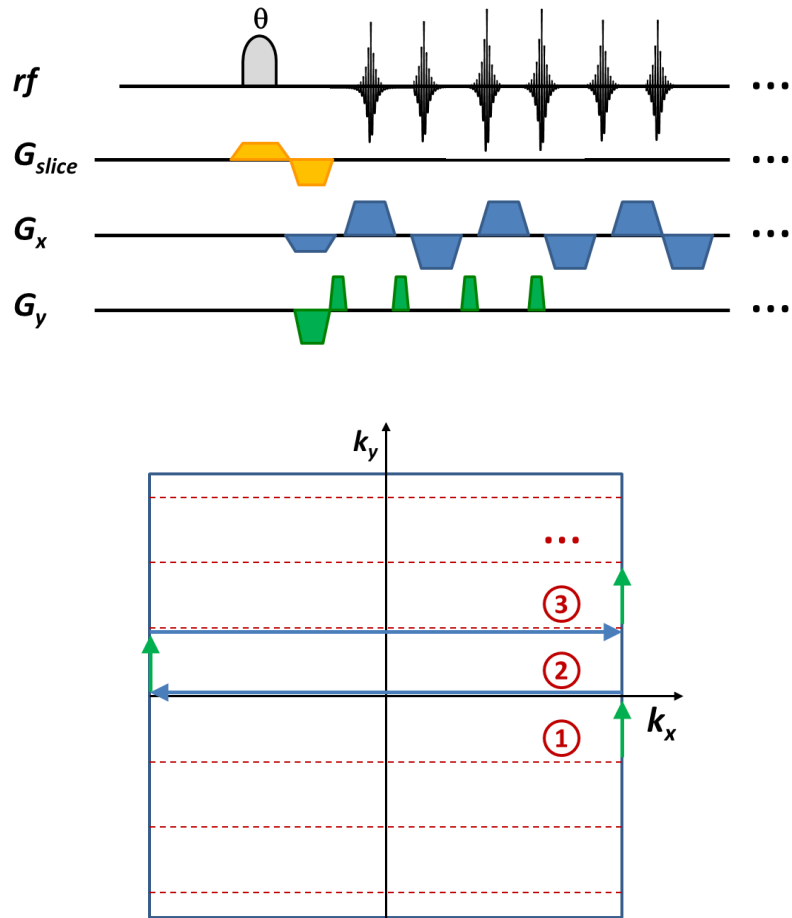


Figure 4-4 : Séquence d'EPI 'blip' et trajectoire dans l'espace des k .

4.5. Imagerie spirale

Une autre séquence permet un remplissage non cartésien de l'espace des k et répond au cahier des charges des espèces hyperpolarisées. Il s'agit de la séquence SPIRAL. Le remplissage de cet espace par une spirale débutant au centre de l'espace des k et s'éloignant progressivement de celui-ci est connu pour être (aussi) très efficace. La distance à parcourir pour décrire l'ensemble de cet espace de façon non cartésienne est inférieure à la distance à parcourir pour décrire le même espace de façon cartésienne. En ce qui

concerne les zones des quatre coins des extrémités de l'espace des k (hautes fréquences spatiales) qui ne sont pas balayé par les procédés non cartésien, elles ne sont pas d'un grand intérêt car elles ne renferment que très peu d'informations nécessaires à la reconstruction des images des espèces hyperpolarisées.

Dans cette technique tout l'espace des k est rempli à la suite d'une impulsion rf. Pendant l'acquisition, les gradients de codage de phase et de lecture ont la forme d'une sinusoïde dont l'enveloppe est croissante (Figure 4-5). Le temps d'acquisition d'une trajectoire est proportionnel à la résolution que l'on souhaite obtenir. La résolution est d'autant meilleure que le temps d'acquisition est long. Cependant ce temps restera limité par le T_2^* puisque pour les espèces hyperpolarisées il est capital d'acquérir le plus rapidement possible le signal après l'impulsion rf. Cette séquence peut être améliorée par l'utilisation de plusieurs entrelacements où chaque entrelacement est balayé par une acquisition (Figure 4-6). Les temps d'acquisitions seraient ainsi courts sans pour autant dégrader la résolution spatiale ou le champ de vue de l'image.

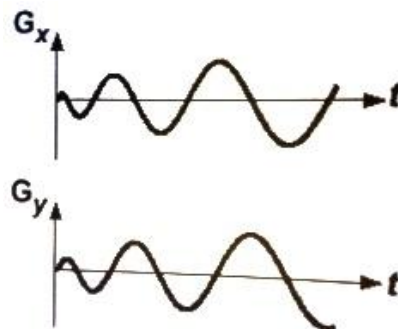


Figure 4-5 : Forme des gradients impliqués dans la séquence SPIRAL 2D.

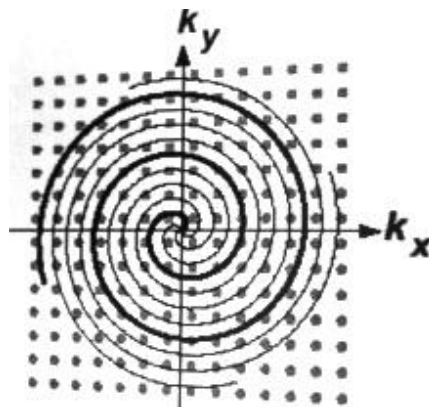


Figure 4-6 : Remplissage de l'espace des k dans la méthode SPIRAL.

Ainsi le codage SPIRAL associe les avantages de l'imagerie par projection-reconstruction à un balayage de l'espace des k encore mieux optimisé en temps.

Bénéficiant de tous ces avantages, les images obtenues avec l'imagerie SPIRAL présentent un meilleur rapport signal sur bruit que les images obtenues avec des techniques de balayage cartésien de l'espace des k . De plus les images issues du codage non cartésien sont moins touchées par les artéfacts de flux et de mouvement en raison des trajectoires en spirale qui minimisent l'accumulation de phase grâce aux inversions régulières et aux symétries des gradients. Cependant les acquisitions spirales et radiales souffrent d'artefact de reconstruction importants ('stray' artefact, 'regridding', etc.).

REFERENCES

- (1) Berthault, P.; Desvaux, H.; Le Goff, G.; Pétero, M. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 314, 52.
- (2) Haase, A.; Frahm, J.; Matthaei, D.; Hänicke, W.; Merboldt, K.-D. *J. Magn. Reson.* **1986**, 67, 258.
- (3) Zhao, L.; Mulkern, R. V.; Tseng, C. H.; Williamson, D.; Patz, S.; Kraft, R.; Walsworth, R. L.; Jolesz, F. A.; Albert, M. *J. Magn. Reson. B* **1996**, 113, 179.
- (4) Svensson, J.; Mansson, S.; Johansson, E.; Petersson, J.; Olsson, L. *Magn. Reson. Med.* **2003**, 50, 256.
- (5) Golman, K.; Olsson, L.; Axelsson, O.; Mänsson, S.; Karlsson, M.; Petersson, J. S. *The British Journal of Radiology* **2003**, 76, S118.
- (6) Ludescher, B.; Martirosian, P.; Klose, U.; Nägele, T.; Schick, F.; Ernemann, U. *Korean Journal of Radiology* **2011**, 12, 554.

Chapitre 5

Systèmes hôtes du xénon

Chapitre 5 – Systèmes hôtes du xénon

La recherche de molécules hôtes pouvant encapsuler des gaz représente un défi d'envergure pour les nombreuses équipes de chimie supramoléculaire qui s'y sont consacré. Depuis l'origine du concept « molécule-cage / molécule encapsulée » ou « molécule hôte / molécule invitée », de nombreuses variétés de molécules ont été synthétisées. Les applications découlant de ce principe clé sont d'une importance considérable puisqu'elles concernent à la fois les disciplines médicales, biologiques et environnementales. Cet outil chimique est utilisé tant pour la reconnaissance moléculaire, la délivrance de médicaments, la séparation, le stockage et la catalyse d'éléments, que pour la constitution de biosondes. A ce titre un nombre important de molécules hôtes spécifiques à l'encapsulation du xénon a été développé. Dans la première partie de ce chapitre, nous passerons en revue quelques exemples de systèmes existants (en nous focalisant sur les molécules-cages), puis à la lumière d'un exemple d'étude de cryptophanes, nous montrerons comment la structure, la thermodynamique et la cinétique d'interaction avec le gaz rare sont analysées. Enfin, nous décrirons les expériences RMN ^{129}Xe utilisant le gaz polarisé mises en œuvre pour détecter le xénon encapsulé.

5.1. Propriétés visées et exemples de systèmes hôtes

5.1.1. Critères de sélection d'une molécule hôte du xénon

Les critères de sélection d'une molécule hôte du xénon sont les suivants :

- Grande affinité pour le gaz rare

La constante d'affinité du xénon pour une molécule est déterminée à l'aide des spectres RMN ^1H et ^{129}Xe quand c'est possible en complément d'autres méthodes telles que les expériences de calorimétrie isotherme à titration (ITC) ou la fluorescence.

En général lorsque le xénon est encapsulé, plus la cavité est petite plus l'affinité du xénon pour la cage est grande mais plus la vitesse d'entrée sortie est faible en contrepartie.¹ J. Rebek a défini en 1998 un rapport permettant d'établir une proportionnalité optimale entre la taille de la cavité de la molécule-cage et celle de la molécule encapsulée.² Ce facteur a été établi à $0,55 \pm 0,09$. Le xénon ayant un volume de 42 \AA^3 , le volume de la molécule-cage idéale serait de 76 \AA^3 .

- Echange entrée/sortie du xénon avec la cage

Le système hôte doit permettre une entrée/sortie du xénon suffisamment lente à l'échelle des écarts de déplacements chimiques xénon pour que l'on ait des signaux distincts, mais assez rapide pour permettre la recharge continue en xénon hyperpolarisé quand le précédent atome ayant occupé la cavité a été dépolarisé.

- Relaxation minime du xénon au sein de la cavité.

Dans les conditions d'échange rapide par rapport à l'échelle de temps, le T_1 xénon observé est exprimé par l'équation suivante :

$$\frac{1}{T_{1obs}} = \frac{1}{T_1^{encapsulé}} x_{encapsulé} + \frac{1}{T_1^{libre}} (1 - x_{encapsulé})$$

Où $x_{encapsulé}$ est la fraction de xénon encapsulé.

Si la relaxation du xénon libre en solution est suffisamment lente, la valeur de $T_1^{encapsulé}$ peut être extraite directement du T_1 obtenu expérimentalement. En ce qui concerne la valeur relative des populations de xénon libre et encapsulé, on détermine le rapport de l'intégrale de l'aire des pics correspondants soit en proton si

l'échange est lent et que la concentration de molécule-cage est connue, soit en xénon 129 si la concentration de xénon dissous est connue.

5.1.2. Systèmes moléculaires pour l'encapsulation du xénon

Nous citerons dans cette partie un certain nombre d'exemples de systèmes hôtes candidats pour l'encapsulation du xénon.

- Nanoparticules

Des nanoparticules microporeuses fonctionnalisées ont été synthétisées en collaboration avec les chimistes de l'IEM et de l'institut Charles Gerhardt de Montpellier, le laboratoire et le CHU Hautepierre de Strasbourg, dans le but de transporter de grande quantité de xénon vers des cibles biologiques d'intérêt.³ La taille de ces particules, de type colloïdale, est d'environ 65 nm. Le diamètre des pores est compris entre 0,5 et 0,6 nm et la surface spécifique est de l'ordre de 300 m².g⁻¹. Les chimistes ont greffé sur ces nanoparticules un peptide de 14 résidus, le facteur FX13, pour la détection spécifique de trombi. Les spectres de la figure 5-1 obtenus au laboratoire montrent d'une part que de grande quantité de xénon sont véhiculées par ce système et d'autre part qu'il existe un échange lent entre le xénon et les nanoparticules.

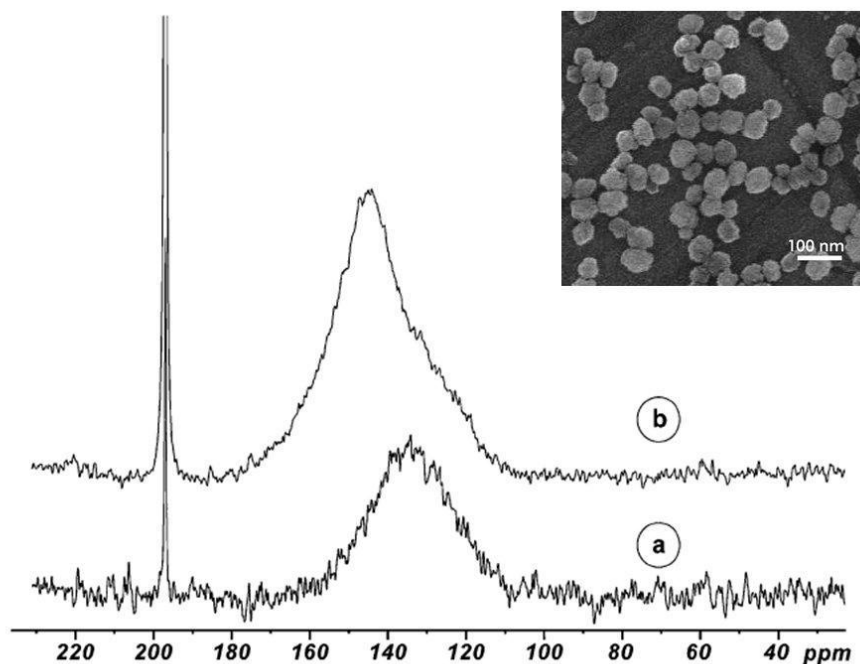


Figure 5-1 : A gauche sont présentés les spectres RMN xénon 129 des nanoparticules fonctionnalisées avec le peptide en solution aqueuse à pH 4. Les spectres sont obtenus en 1 scan. En a) 10,7 mg de nanoparticules sont dissous dans 420 μ l de solution tamponnée à pH 4 et 0,5 bar de xénon sont introduits dans le tube RMN. En b) 5,8 mg de nanoparticules sont dissoutes dans la même solution avec une pression de xénon de 1 bar. En haut à droite est représentée l'image de microscopie électronique des nanoparticules microporeuses utilisées.³

La fonctionnalisation de ces nanoparticules a donné lieu à des suspensions aqueuses stables laissant l'accès aux pores libres. De plus, les résultats ont mis en évidence des temps de relaxation du xénon à l'intérieur des pores relativement longs. Cependant, l'échange du xénon entre l'intérieur et l'extérieur des pores s'est révélé trop lent pour que l'on en puisse bénéficier pleinement pour l'approche de biosonde.

- Cyclodextrines

La cyclodextrine est une molécule-cage d'origine naturelle découverte en 1891. C'est un oligosaccharide cyclique provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon. Il est constitué de 6 à 12 motifs glucose reliés entre eux par des liaisons α 1–4. L' α -cyclodextrine (Figure 5-2) qui possède la plus petite cavité (6 unités glucose) a un volume compris entre 140 et 170 \AA^3 et une affinité pour le xénon

d'environ 20 M^{-1} à 298 K dans l'eau,⁴ trop faible pour les applications qui nous intéressent.

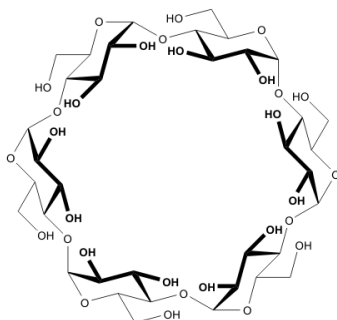


Figure 5-2 : Structure de l' α -cyclodextrine.

- Calixarènes

Ces molécules sont des macrocycles issus de la réaction d'un phénol à n unités ($n=4-20$) et d'un aldéhyde en milieu basique. Les n unités phénoliques sont reliées entre elles par des chaînes méthyléniques. Les calixarènes disposent d'une région hydrophile au niveau des groupements hydroxyle et d'une cavité hydrophobe entre les noyaux benzéniques. L'affinité pour le xénon est de 14 M^{-1} pour le calix[4]arène par exemple dans l'eau à 298 K (Figure 5-3),⁵ aussi trop faible pour constituer une bonne molécule hôte du xénon.

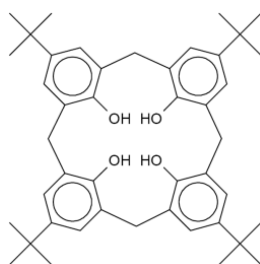


Figure 5-3 : Structure d'un calix[4]arène.

- Cucurbiturils

Ces macrocycles sont issus de la réaction du glycoluril avec un aldéhyde en milieu acide. On les note cucurbit[n]uril avec $n=5-10$ (abréviation CB[n] ou CBn). Le volume

de leur cavité varie entre 82 et 870 Å³ et l'affinité du xénon pour le CB[6] (Figure 5-4) par exemple est de 200 M⁻¹ en solution aqueuse acide à température ambiante.⁶ L'échange est lent à l'échelle des déplacements chimiques xénon (le déplacement chimique du xénon encapsulé dans CB[6] est voisin de 110 ppm à température ambiante). Des développements synthétiques devront être entrepris pour augmenter l'affinité du xénon pour ces molécules.

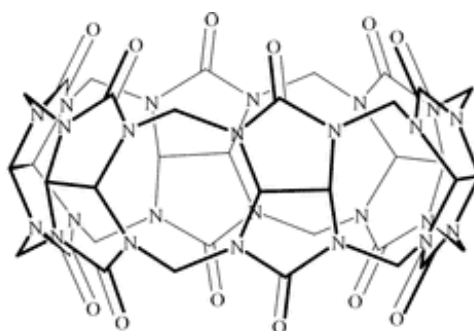


Figure 5-4 : Structure du cucurbit[6]uril

- Cryptophanes

En 1981, André Collet introduit un nouveau type de molécule dans la conception des systèmes hôtes en synthétisant pour la première fois ce qu'il nommera lui-même les cryptophanes. Les cryptophanes sont des molécules dont la cavité hydrophobe est délimitée par 2 unités cyclotribenzylènes notées CTB. Ces 2 unités sont liées par des chaînes (O-(CH₂)_{n,m}-O) de longueurs différentes (n ou m) déterminant ainsi la taille de la cavité (Figure 5-5).⁷ Pour chaque chaîne, *n* et *m* peuvent varier de 1 à 5. R1 et R2, les substituants des cycles aromatiques, représentent par défaut le groupement OCH₃. De cette façon les cryptophanes peuvent être modulés en fonction de la taille de molécule voulue et de la fonctionnalisation que l'on souhaite obtenir. Il existe un grand nombre d'isomères de ces molécules notamment en raison de leur chiralité (due aux jonctions liant les unités CTB) et aux formes anti et syn qu'elles peuvent prendre. De plus, leur flexibilité, l'environnement extérieur et la molécule qui occupe leur cavité créent une grande diversité de formes de cryptophanes (par exemple des formes implosées).

L'affinité du xénon pour les cryptophanes peut atteindre jusqu'à 29000 M^{-1} (à 293 K pour le cryptophane-111 hydrosoluble).⁸ Etant donné ces grandes valeurs d'affinité, les cryptophanes constituent de loin les meilleures molécules pour l'encapsulation du xénon hyperpolarisé. C'est pourquoi nous nous intéresserons exclusivement à ce type de molécule pour cette thèse.

Les premiers cryptophanes synthétisés (cryptophanes « parents ») étaient solubles dans des solvants chlorés. Les plus connus sont : le cryptophane A pour lequel $n=m=2$ et $R_1=R_2=\text{OCH}_3$. Celui-ci correspond selon notre appellation au cryptophane 222-hexa-methoxy. Le cryptophane E ou 333-hexa-methoxy ($R_1=R_2=\text{OCH}_3$ et $n=m=3$) ou encore le cryptophane 111 ($R_1=R_2=\text{H}$ et $n=m=1$), qui est le plus petit cryptophane organosoluble synthétisé récemment⁹ (si l'on excepte le cryptophane-000, où les CTB sont reliés par des ponts di-sulfure),¹⁰ sont d'autres éléments de cette grande famille.



Figure 5-5 : Structure générique d'un cryptophane avec n et m les longueurs de chaîne reliant les 2 CTB et R_1 et R_2 les substituants des cycles aromatiques en ortho des oxygènes.

Ces molécules-cages ont un cœur hydrophobe. Les chimistes ont pu les rendre solubles dans l'eau grâce à l'introduction de groupements hydrophiles en position R_1 et/ou R_2 .^{1,11}

En raison de sa petite taille, le xénon a une grande affinité pour le cryptophane 111 hydrosoluble⁸ (Figure 5-6) mais une faible vitesse d'entrée/sortie vis-à-vis de celui-ci ($\sim 10 \text{ Hz}$ à température ambiante).

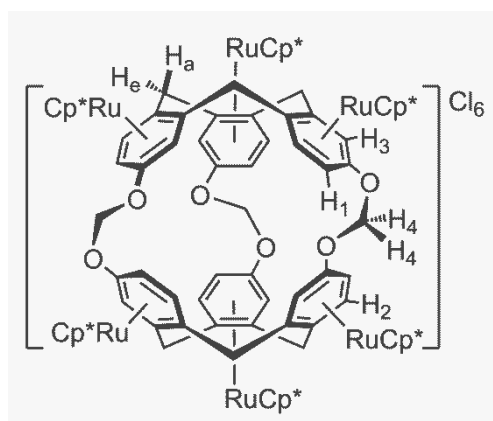


Figure 5-6 : Cryptophane-111 métallé.⁸

5.2. Caractérisation des cryptophanes par RMN

Lorsqu'une nouvelle molécule hôte du xénon nous est proposée, notre outil principal, la résonance magnétique nucléaire, est utilisé pour caractériser sa structure et les interactions avec le gaz rare. A titre d'exemple, nous montrons ici une étude préliminaire qui vise à comprendre l'interaction de nouveaux cryptophanes avec le xénon.

Afin d'optimiser l'utilisation de ces molécules-cages pour notre approche de biosonde à base de xénon, les cryptophanes 112 (**1**) et 122 (**2**), de taille de cavité intermédiaire entre celles des cryptophanes-111 et -222, ont été synthétisés par l'équipe de Bernard Rousseau¹² dans le but d'augmenter la vitesse d'échange du xénon dans la cage (par rapport au cryptophane-111) tout en conservant une bonne affinité (meilleure que celle du cryptophane-222).

Nous comparons ici trois cryptophanes, nommés **1**, **2**, et **3**, dont la structure est donnée en figure 5-7. Le cryptophane **3**, qui est le cryptophane-222, a été synthétisé par Thierry Brotin à l'ENS Lyon (les methoxy du cryptophane-A sont remplacés par des hydrogènes).¹³

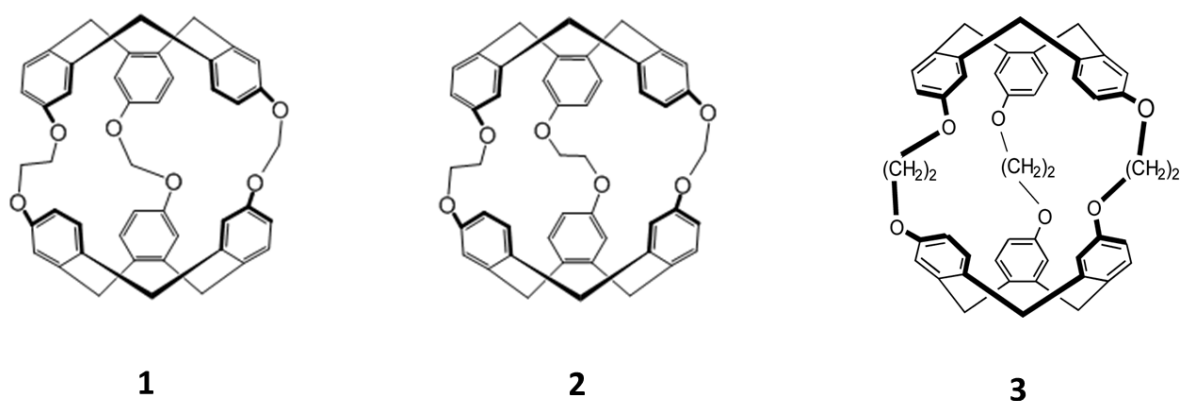


Figure 5-7 : Structure des cryptophanes **1-3**.

La première étape de notre étude a consisté à prouver l'encapsulation du xénon par ces nouveaux cryptophanes. Nous avons donc réalisé une étude RMN xénon 129 de la molécule en présence de gaz hyperpolarisé (Figure 5-8). En enregistrant les spectres RMN du ^{129}Xe hyperpolarisé des composés **1**, **2** et **3** en solvant organique nous avons observé que la bonne affinité du xénon pour ces cages était conservée mais qu'étonnamment la vitesse d'échange du xénon avec les composés **1** et **2** était plus élevée que celle avec le composé **3**. En effet, si un pic apparaît bien dans la région 30-60 ppm pour le gaz rare en présence de **3**, il n'en est pas de même pour **1** et **2** pour lesquels aucun pic distinct n'est présent dans cette même région du spectre.

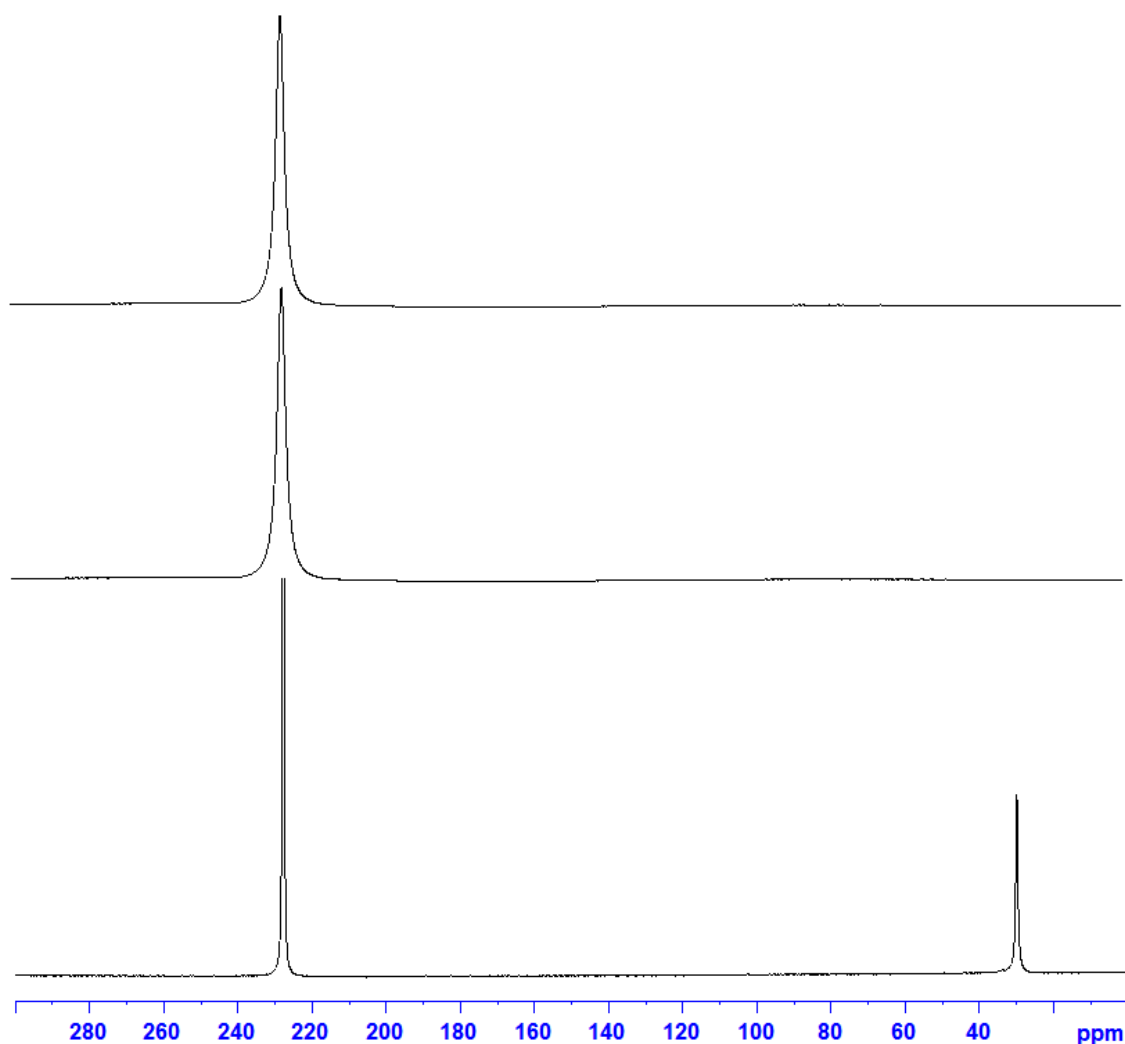


Figure 5-8 : Spectres ^{129}Xe des composés **1** (en haut), **2** (au milieu) et **3** (en bas) à $\sim 360\ \mu\text{M}$ dans le 1,1,2,2-tetrachloroéthane- D_2 en 1 scan à 293 K et 11,7 T.

Dans un second temps, la température d'étude a été diminuée pour ralentir l'échange. A $T=273\ \text{K}$ un signal très large dans la région 30-60 ppm a été observé pour les cryptophanes **1** et **2**, ce qui privilégie l'hypothèse de l'encapsulation du xénon par la cage.

Le comportement du composé **1** en présence de différents solvants a également été étudié pour vérifier que le solvant n'intervenait pas drastiquement dans la vitesse d'échange (Figure 5-9).

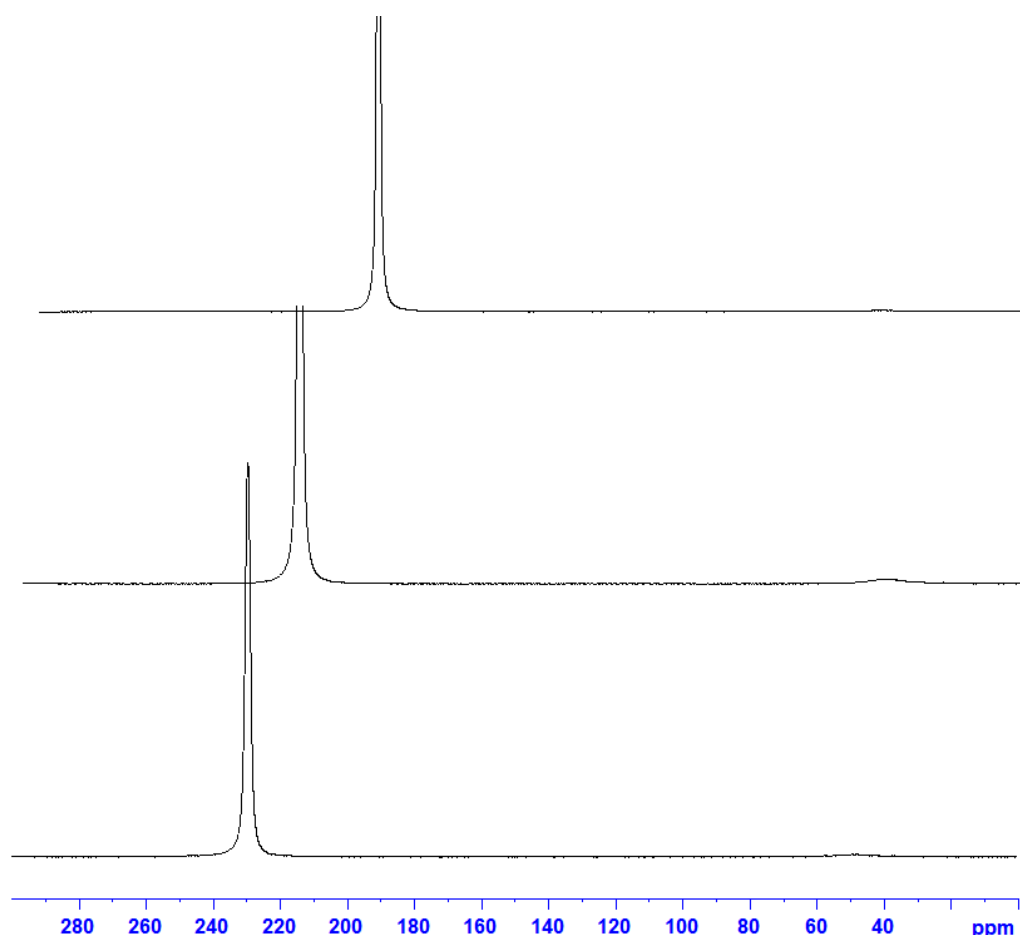


Figure 5-9 : Spectres ^{129}Xe du cryptophane **1** (à $\sim 360 \mu\text{M}$) dans trois différents solvants à 273 K à 11.7T. En bas : 1,1,2,2-tétrachloroéthane-D₂; au milieu : chloroforme-D; en haut : dichlorométhane-D₂. Les spectres ont été calibrés selon Miller et al.¹⁴

Les spectres ^{129}Xe du composé **1** réalisés dans les solvants chloroforme et dichlorométhane ne montrent pas de différence significative dans la région 30-60 ppm par rapport au 1,1,2,2-tétrachloroéthane. Ce résultat nous assure donc que le solvant n'est pas responsable de la faible vitesse d'échange observée pour le xénon dans les composés **1** et **2**.

Pour prouver cette encapsulation nous avons eu recours à la méthode SPINOE (Spin Polarization Induced NOE) (Figure 5-10) qui en plus de certifier la présence du xénon au sein de la cavité à température ambiante, pourrait nous donner accès à des informations sur la position du xénon au cœur de la cavité.

L'expérience de SPINOE proposée en 1996 par Navon et al.¹⁵ consistait à observer le transfert de polarisation du xénon hyperpolarisé aux protons les plus proches par relaxation dipolaire croisée. La première implémentation de cette séquence consistait à faire une succession de spectres ^1H pour observer l'augmentation de l'intensité des signaux ^1H significatifs du transfert de polarisation. Afin de pouvoir être quantitatif, Luhmer et al.¹⁶ ont ajusté cette séquence en la faisant précéder d'une saturation des protons pour que n'apparaissent sur le spectre que les protons ayant bénéficié du transfert de polarisation à partir du xénon hyperpolarisé.

La figure 5-10 présente la séquence que nous avons utilisée pour l'observation du transfert de polarisation. Dans ce schéma, la présaturation des protons s'effectue au moyen d'impulsions successives de 90° où chaque impulsion est suivie d'un gradient de défocalisation. Une fois les protons saturés, l'inversion du xénon est réalisée (un scan sur deux) par une première impulsion à balayage de fréquence CHIRP¹⁷ suivie d'un temps de mélange τ_m pendant lequel s'effectue le transfert de polarisation par relaxation dipolaire croisée $^{129}\text{Xe}-^1\text{H}$. Les impulsions à balayage de fréquence CHIRP ont été préférées à des impulsions dures de 180° (bien que leur durée soit plus grande) car elles permettent de s'affranchir de l'effet d'amortissement cohérent causé par l'importante aimantation du xénon.¹⁸ En fin de séquence, une seconde impulsion d'inversion CHIRP assure que les spins xénon reviennent dans le même sens de polarisation que tous les autres spins de xénon non excités. Une impulsion de lecture composite ($90^\circ x - 90^\circ y$) est introduite pour stabiliser la séquence d'impulsion.¹⁹

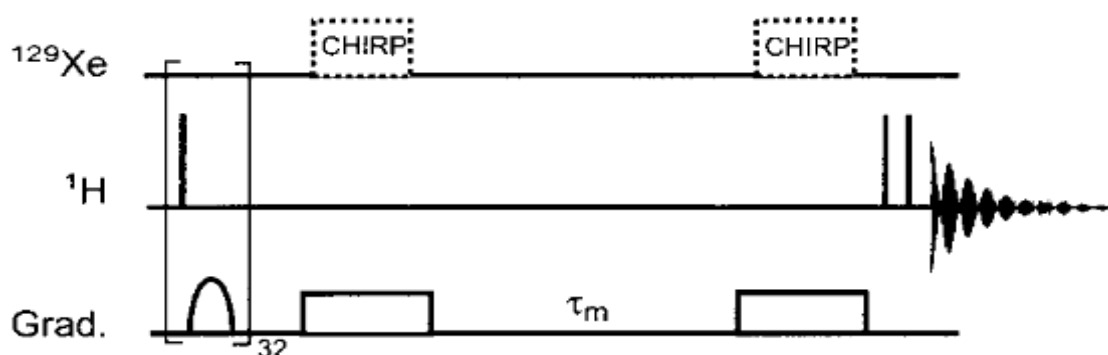


Figure 5-10 : Séquence SPINOE. Les impulsions ^1H (représentées par des rectangles noirs) sont des impulsions 90° . Les phases des 2 dernières impulsions ^1H sont décalées de 90° . Les pointillés sur les impulsions d'inversion xénon (CHIRP) indiquent que celles-ci sont réalisées 1 scan sur 2.¹⁹

L'application de la séquence SPINOE au cryptophane **2** nous donne les spectres ^1H de la figure 5-11. Dans cette figure un certain nombre de protons apparaissent avec des intensités différentes. La présence de ces signaux démontre qu'ils ont bénéficié d'un transfert de polarisation par relaxation dipolaire croisée à partir du xénon polarisé. En considérant la molécule comme rigide les différentes intensités des protons révèlent la distance r qui les sépare du xénon selon l'interaction dipôle-dipôle, proportionnelle à $1/r^6$. Ainsi on peut voir que les protons concernés par cette interaction dipolaire avec le xénon sont majoritairement les protons aromatiques. Les protons aliphatiques des chaînes reliant ces cycles aromatiques répondent plus faiblement ce qui révèle peut être une dynamique des chaînes. Ce résultat correspond parfaitement à l'hypothèse où le xénon prend place à l'intérieur de la cavité de la molécule hôte, à proximité (principalement) des cycles aromatiques des 2 CTB et (secondairement) des chaînes reliant ces CTB.

En changeant l'hélicité de la lumière (en faisant tourner la lame quart d'onde du montage de pompage optique de 90° ou en changeant le sens du courant électrique des bobines pour inverser le sens du champ magnétique) lors de l'étape de polarisation du xénon (et en conservant les paramètres de phase constants) nous obtenons exactement le symétrique (en bleu) de la première figure de SPINOE (en rouge) ce qui prouve d'autant plus la réussite de cette expérience où seuls les protons ayant reçu la polarisation du xénon apparaissent sur le spectre.

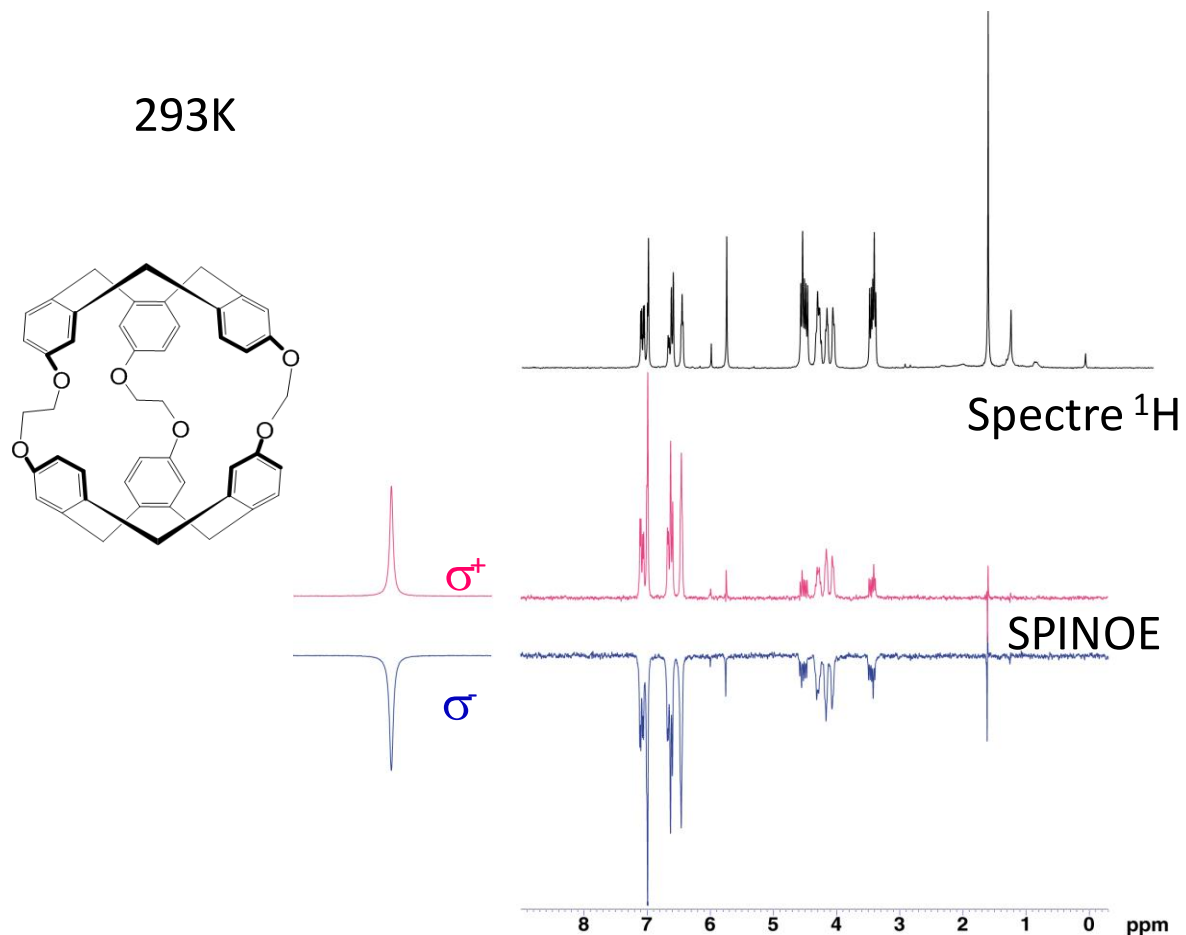


Figure 5-11 : Spectre ^1H et SPINOE réalisés avec une polarisation des photons σ^+ ou σ^- sur le cryptophane **2** dans le 1,1,2,2-tétrachloroéthane- d_2 à 293 K et 11.7 T, en 8 scans et avec un temps de mélange de 500 ms. A gauche, structure de la molécule et spectres ^{129}Xe hyperpolarisé correspondants (obtenus après impulsion à très faible angle de basculement).

Dans un second temps, toujours pour tenter de comprendre la dynamique d'entrée/sortie du xénon dans la cage, nous avons réalisé l'attribution des signaux ^1H et ^{13}C des composés **1**, **2** et **3** au moyen d'expériences TOCSY, ROESY hors-résonance, HSQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C . Le spectre ^1H du composé **1** à 293 K est présenté en figure 5-12. La nomenclature utilisée pour l'attribution est décrite en figure 5-13 et les déplacements chimiques ^1H des cryptophanes **1-3** sont donnés en Table 5-1.

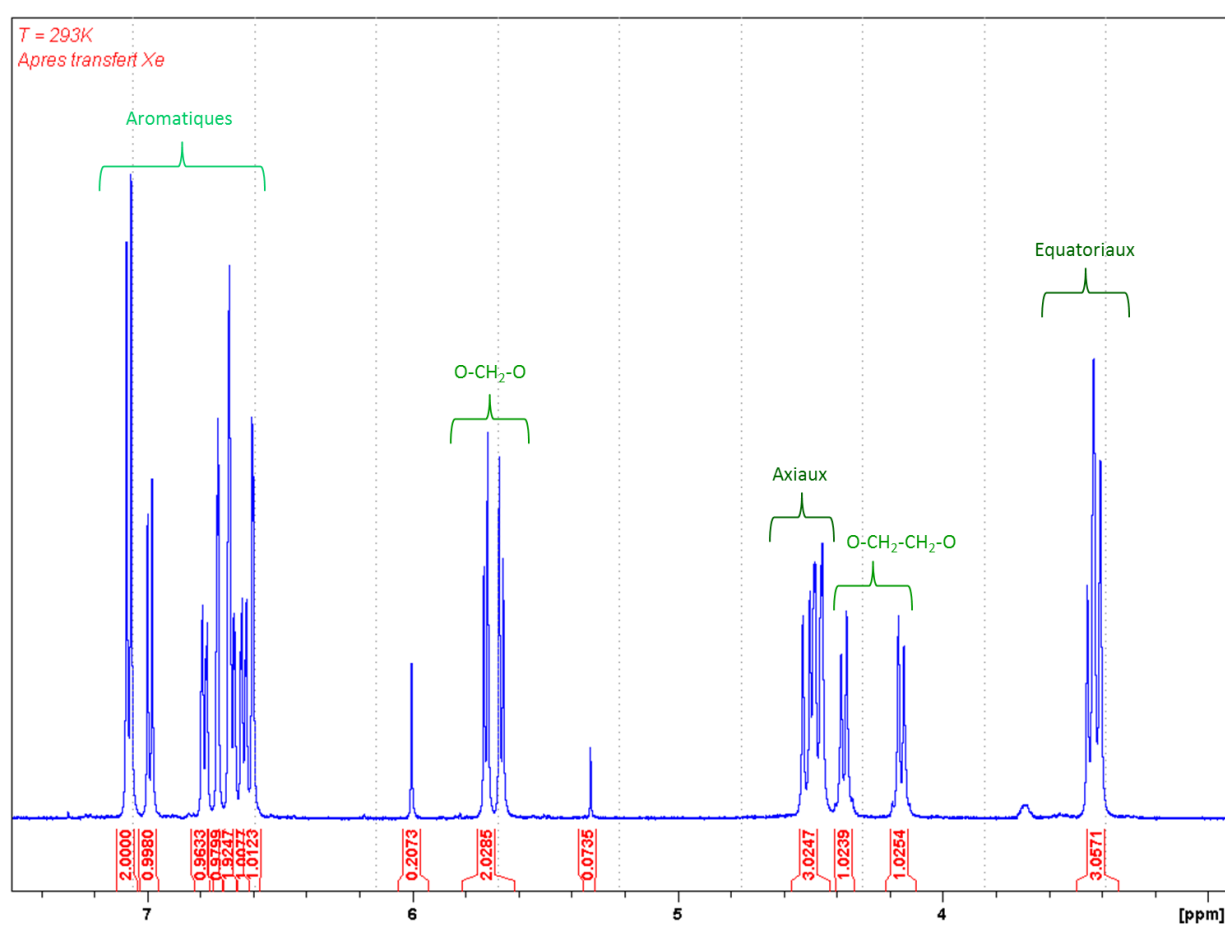


Figure 5-12 : Spectre ^1H du composé **1** (cryptophane 112) dans le 1,1,2,2-tetrachloroéthane-d₂ à 293K et 11.7 T.

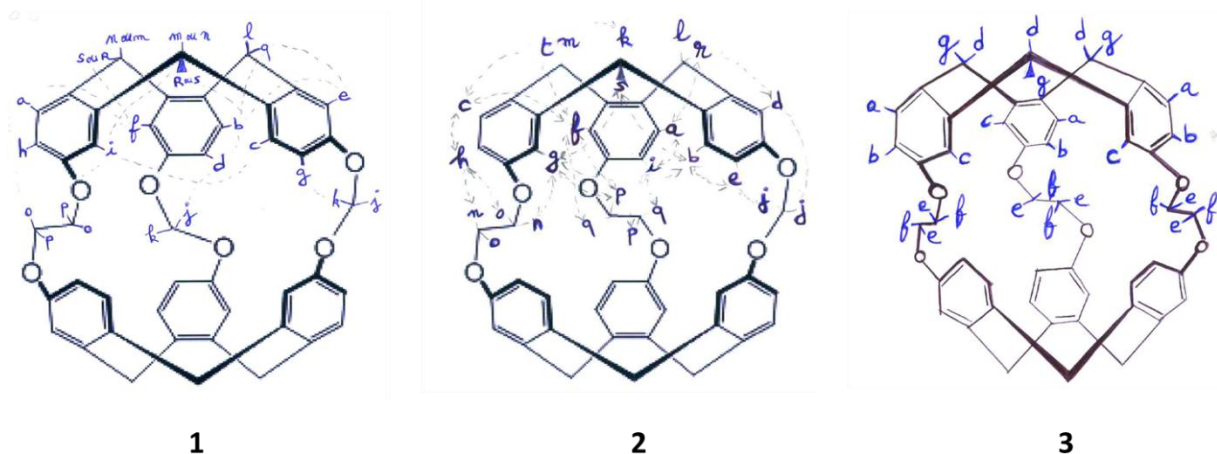


Figure 5-13 : Structures des composés **1**, **2** et **3** avec les lettres utilisées pour l'attribution.

¹ H	1 (ppm)	2 (ppm)	3 (ppm)
a	7,07	7,11	7,04
b	7,07	7,06	6,66
c	6,99	7–	6,50
d	6,78	7+	4,55
e	6,73	6,67	4,22
f	6,69	6,63	4,19
g	6,68	6,6	3,44
h	6,63	6,47	–
i	6,6	6,45	–
j	5,72	5,75	–
k	5,66	4,57	–
l	4,51	4,54	–
m	4,47	4,49	–
n	4,47	4,33	–
o	4,37	4,28	–
p	4,15	4,17	–
q	3,44	4,07	–
r	3,42	3,48	–
s	3,41	3,43	–
t	–	3,41	–

Table 5-1 : Déplacements chimiques ¹H des composés **1-3** dans le 1,1,2,2-tetrachloroéthane-d₂ à 293K.

Dans l'étape suivante des expériences de ROESY hors résonance 2D ont été réalisées à l'angle magique,²⁰ à même puissance de champ radiofréquence et à différents temps de mélange : 50, 75, 100, 200 et 300 ms.

Prenons l'exemple du composé **2** (le même protocole a été utilisé pour les autres cryptophanes). Le traitement des cartes nous a fourni 79 informations d'interaction dipolaire croisée σ_i . Ces données ont été transformées en contraintes de distance r_i en utilisant la relation $\frac{\sigma_{ref}}{\sigma_i} = \left(\frac{r_i}{r_{ref}}\right)^6$ et la distance de référence entre 2 protons géminés $r_{ref} = 1,76 \text{ \AA}$.

48 contraintes de distance ont été ainsi obtenues après réduction due à la prise en compte des taches des 2 côtés de la diagonale. Celles-ci ont été utilisées dans un logiciel de modélisation moléculaire. La modélisation moléculaire est entreprise dans le but de comprendre et de tenter d'expliquer la dynamique qui a lieu au niveau des chaînes reliant les 2 CTB.

La plus grande difficulté de ce travail a été qu'aucun champ de force n'existant pour les cryptophanes, il a fallu créer les fichiers de topologie et de paramètres à partir de travaux de la littérature, en particulier les travaux de P. D. Kirchhoff.^{21,22} Un logiciel de recuit simulé sous contraintes de distance (sous CNS) nous a permis d'obtenir 50 structures. Une sélection à partir de critères sur l'énergie covalente et van der Waals ainsi que le respect des contraintes de distance a retenu 44 structures. La figure 5-14 présente l'une de ces 44 structures obtenues.

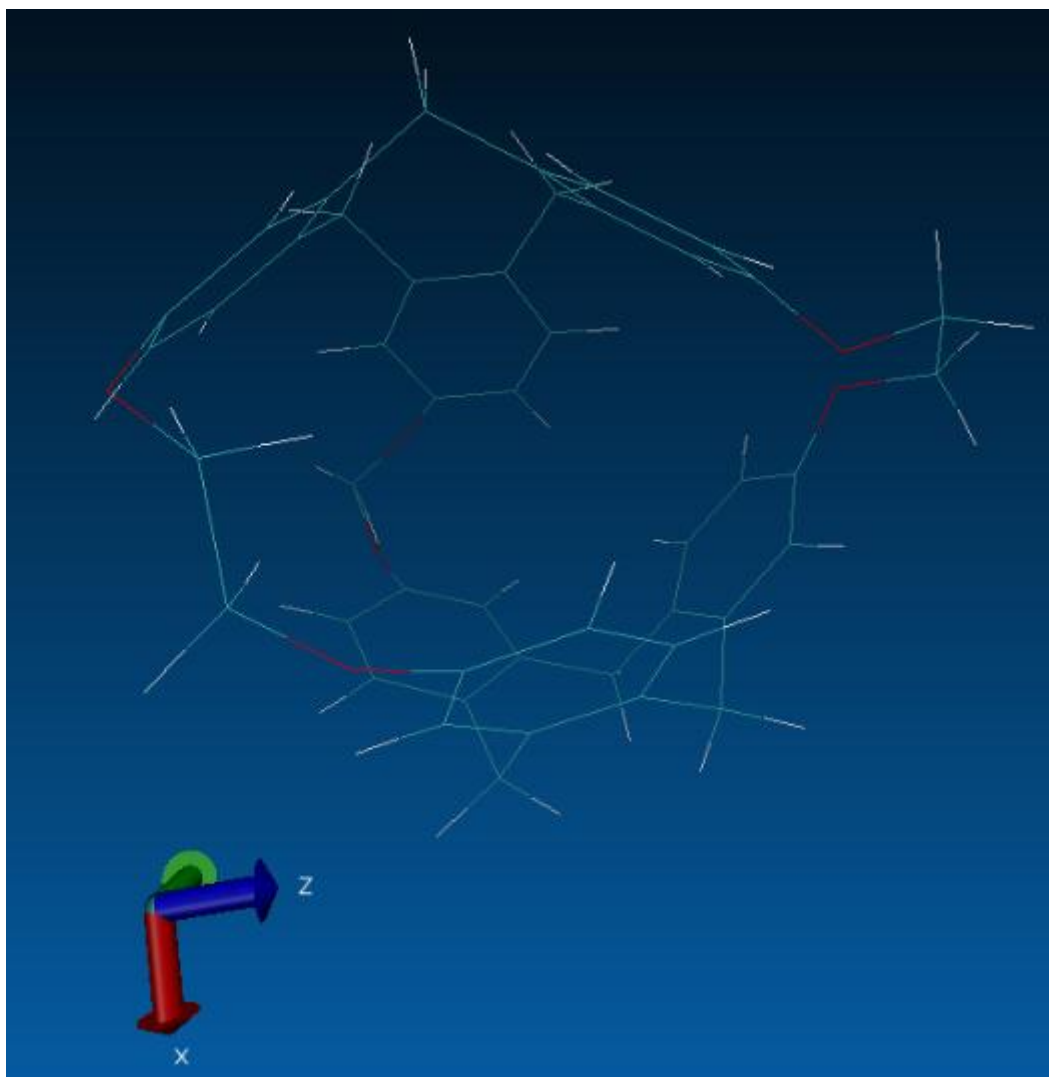


Figure 5-14 : Exemple de structure obtenue par modélisation pour le composé **2**.

Ce travail, qui faute de temps n'a pu être achevé, devra être complété par d'autres expériences de ROE hors résonance à angle constant, mais à différentes puissances de champ radiofréquence et de décalage d'offset. L'idée est de suivre les éventuelles différences de dynamique des bras $\text{O}-(\text{CH}_2)_n\text{-O}$ qui pourraient expliquer la grande dynamique d'entrée-sortie du xénon dans le cas des cryptophanes **1** et **2**, par rapport à celle du cryptophane **3**.

5.3. Séquences RMN ^{129}Xe spécifiques

Pour détecter un signal caractéristique de la présence de xénon encapsulé dans une biosonde, il existe deux méthodes. Dans le cadre de la méthode directe, une série d'impulsions rf à la fréquence du xénon encagé est employée. Dans la méthode indirecte, la fréquence du xénon encapsulé est saturée et la variation d'intensité sur le pic majoritaire de xénon libre est observée. Ces deux séquences profitent de l'important réservoir de polarisation que constitue le xénon libre (dissous pour la sonde en solution aqueuse ou gazeux pour l'imagerie des poumons par exemple), et de l'échange du xénon entre ces deux environnements. Sans cet échange, aucune de ces séquences ne serait utilisable.

5.3.1. Excitations sélectives en fréquence

La figure 5-15 représente la méthode directe où une série d'impulsions radiofréquences est sélectivement émise à la fréquence du xénon encapsulé.

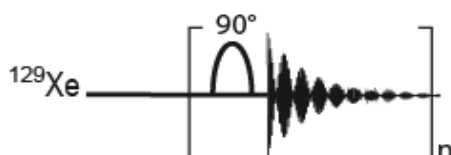


Figure 5-15 : Série d'impulsions radiofréquences sélectives en fréquence utilisées pour la détection directe du xénon encapsulé dans sa cage (avec n le nombre de fois que la séquence est répétée).

Au laboratoire cette méthode nous a permis d'atteindre un seuil de détection de $2 \cdot 10^{12}$ spins (4 picomoles) représentant une concentration de 12.8 nM de cryptophane à 11.7 T et 310 K, en 3600 scans ($n=3600$) et 154 s.²³

Les avantages de cette méthode résident dans la simplicité de la séquence, la bonne sélectivité en fréquence, la facilité de l'implémenter et de l'adapter en imagerie (le temps caractéristique d'entrée-sortie du xénon de la cavité de cryptophanes est de l'ordre de 10 à 30 ms à température ambiante, ce qui correspond bien au temps d'acquisition en IRM) ainsi que dans la possibilité de multiplexage qu'elle offre (détection simultanée de plusieurs biosondes).

A côté de tous ces avantages, cette méthode a le défaut d'ajouter le bruit à chaque accumulation ce qui est un frein pour atteindre des seuils de détection encore plus bas.

5.3.2. HyperCEST

L'autre méthode qui permet la détection du xénon encapsulé est la méthode HyperCEST.²⁴ Cette séquence proposée en 2006 par l'équipe de Pines pour les gaz hyperpolarisés découle des techniques CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer)²⁵ et PARACEST en IRM ^1H .²⁶

Cette méthode de détection a été élaborée en premier lieu dans le but de s'affranchir du bruit qui s'ajoute à la suite de chaque impulsion dans la méthode directe. La séquence d'hyperCEST consiste à effectuer 1 saturation à la fréquence du xénon encagé dans la sonde (correspondant à un pic d'intensité relativement faible) et à observer les variations du signal à la fréquence du xénon libre en solution (correspondant à un pic d'intensité relativement élevé).

Pour ce faire il existe 2 façons de procéder.

La première consiste à alterner une séquence de saturation à la résonance du pic de xénon encapsulé puis hors résonance (idéalement symétriquement par rapport à la fréquence du signal de xénon libre) et de faire la soustraction des deux spectres obtenus. Le signal résiduel est témoin de l'échange entre le réservoir de xénon dissous et le xénon dans la cavité du cryptophane.

La seconde façon de procéder repose sur l'utilisation d'une impulsion de saturation de fréquence variable. Un pic d'intensité variable pour le xénon libre est obtenu de cette manière pour chaque fréquence appliquée. On obtient ainsi une série de pics dont l'enveloppe présente un creux nous informant sur la présence et la localisation de la sonde. C'est ce qu'on appelle un spectre z.

D'une part, malgré l'alternative que représente l'HyperCEST par rapport à la détection directe, elle comporte un certain nombre d'artefacts non négligeables. Une source d'artefact est contenue dans l'imperfection de la saturation qui n'est en pratique jamais totale. Ceci implique que l'aimantation ' $^1\text{Xe@biosonde}$ ' n'est pas complètement annulée à la fin d'une impulsion de saturation.

D'autre part, si le multiplexage est possible en utilisant la méthode directe, le moyen de réaliser une sélection en fréquence de 2 biosondes en utilisant l'hyperCEST n'est pas aussi évident.

5.3.3. Détection directe et HyperCEST en imagerie

5.3.3.1. Utilisant un écho de gradient

➤ DETECTION DIRECTE

- 1 seul cryptophane

Pour détecter directement le xénon encapsulé dans un cryptophane, la séquence décrite en figure 5-16 peut être utilisée. Suite à une impulsion sélective à la fréquence du xénon encapsulé dans sa cage, et un encodage de phase, l'écho de gradient dans la dimension de lecture permet l'encodage de fréquence. Cette séquence peut être répétée n fois en utilisant la même impulsion sélective en fréquence.

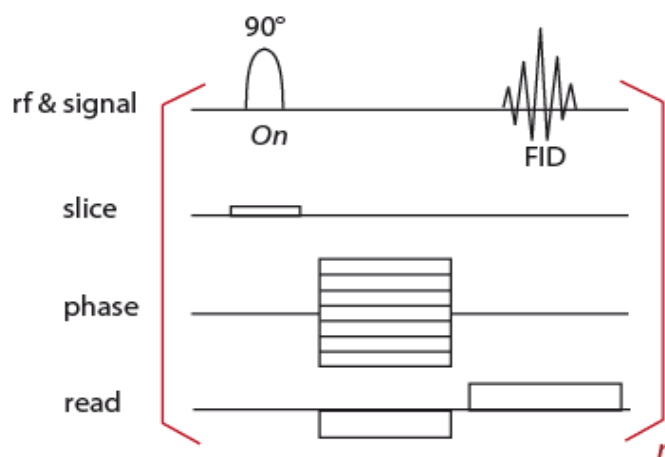


Figure 5-16 : Séquence d'imagerie utilisée pour la détection directe du xénon encapsulé dans un cryptophane (ou biosonde) (séquence basée sur un écho de gradient).

- Détection simultanée de deux cryptophanes (multiplexage)

Le cas d'un système à plusieurs cryptophanes requiert autant d'impulsions sélectives en fréquence qu'il y a de fréquences de résonance du xénon encapsulé (Figure 5-17). En détection directe, il est par conséquent possible de réaliser un multiplexage en utilisant une liste de fréquences pour les impulsions d'excitation (initialement destinées à l'IRM multitranche).

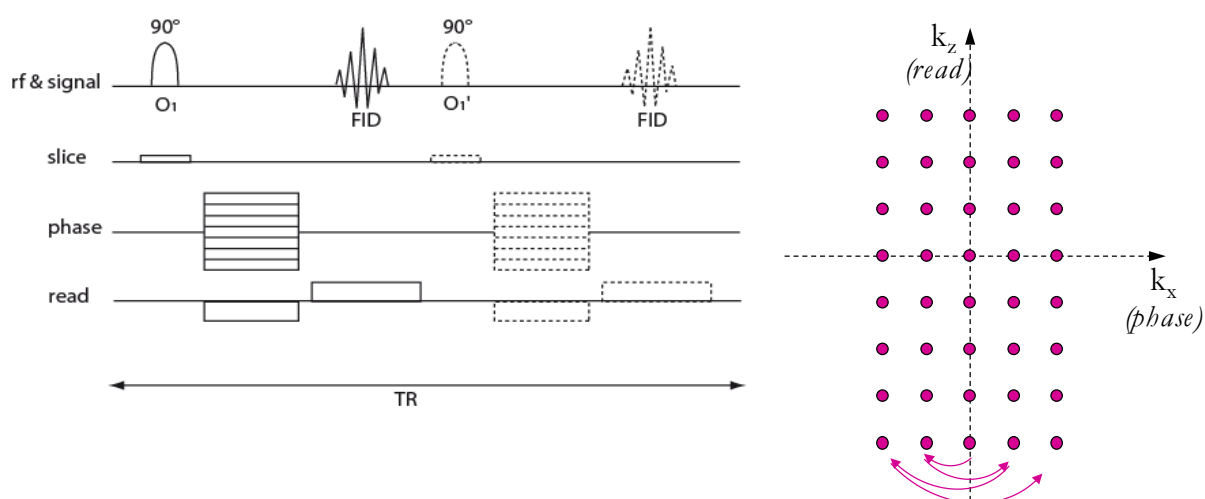


Figure 5-17 : Séquence d'imagerie utilisée pour la détection directe du xénon encapsulé dans différents cryptophanes (ou différentes biosondes) (séquence basée sur une série d'échos de gradient).²⁷

Grâce à cette méthode le laboratoire a pu détecter simultanément 2 cryptophanes dans 2 phases distinctes: le cryptophane 111 solubilisé dans le chloroforme et le cryptophane-222 hexa-carboxylate solubilisé dans l'eau.²⁷

Le problème subsistant dans ce type de séquence réside dans le besoin de maintenir la séparation en fréquence des signaux, qui influe sur la largeur de tranche minimale utilisable. En voici l'illustration (Figure 5-18):

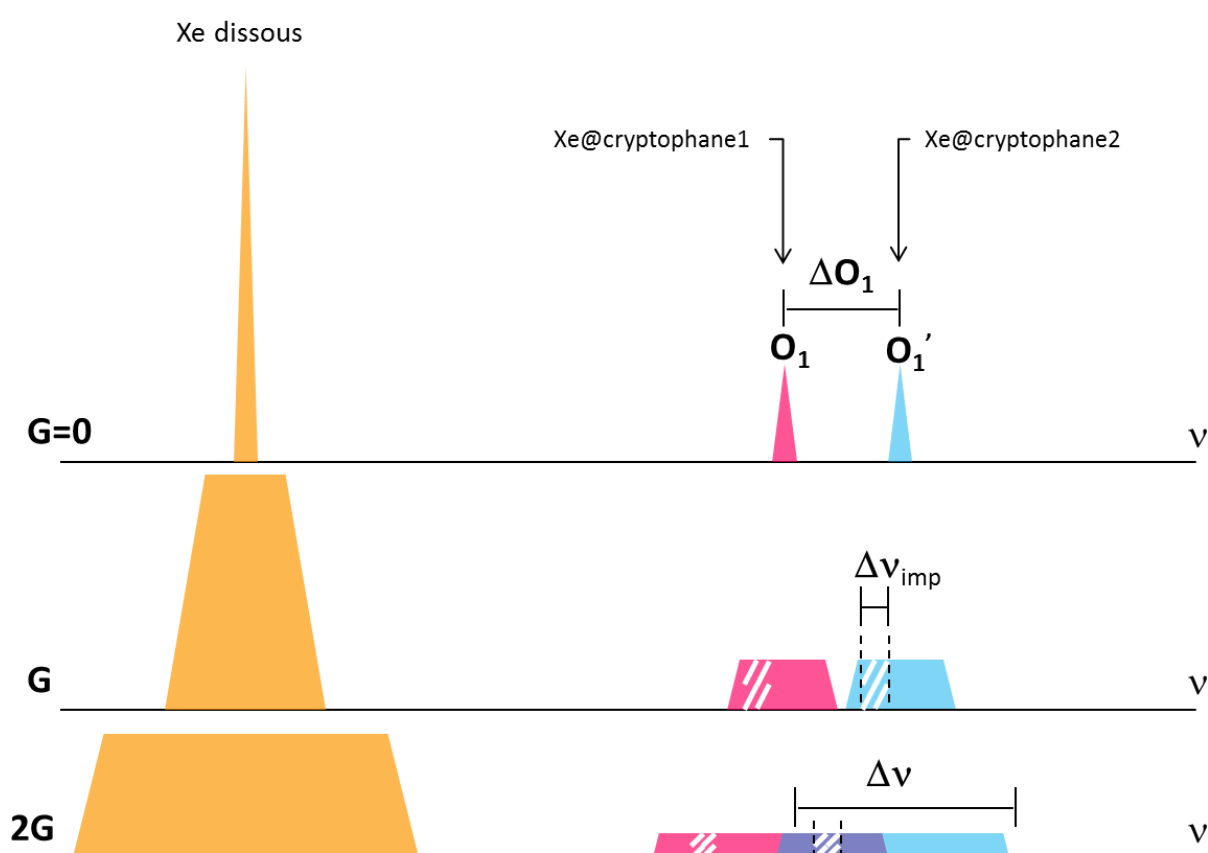


Figure 5-18 : Effet des gradients de champ magnétique sur le spectre ^{129}Xe de deux cryptophanes (voir texte). La situation dépeinte en bas correspond à l'utilisation d'un gradient trop fort, qui potentiellement fait perdre l'information de nature chimique (différentiation des 2 cryptophanes), partie violette sur la figure.

D'après la relation redémontrée dans la partie 2.1.2.1 du chapitre 2, on sait que : $\Delta v = \gamma Gr$.

Or si l'on souhaite séparer 2 signaux sur le spectre il est nécessaire que leur écart en fréquence soit tel que : $\Delta v < \Delta O_1$ c'est à dire que $G < \frac{\Delta O_1}{\gamma r}$ pour un objet de taille r . On conclut de cette inégalité une limite supérieure au gradient de tranche.

La solution à laquelle nous pourrions penser pour compenser la faiblesse du gradient de tranche serait de diminuer la largeur de fréquence couverte par l'impulsion (en allongeant sa durée). Cependant, celle-ci est limitée à la valeur Δv_{imp}^{min} , en deçà de laquelle des problèmes de relaxation transversale pendant l'application de l'impulsion deviennent prédominants. Ceci impose donc de toute façon une proportion minimale de l'objet sélectionné telle que :

$$\frac{\Delta r}{r} > \frac{\Delta v_{imp}^{min}}{\Delta O_1}$$

➤ HyperCEST

Un schéma proposé pour la séquence HyperCEST-écho de gradient est représentée en figure 5-19.

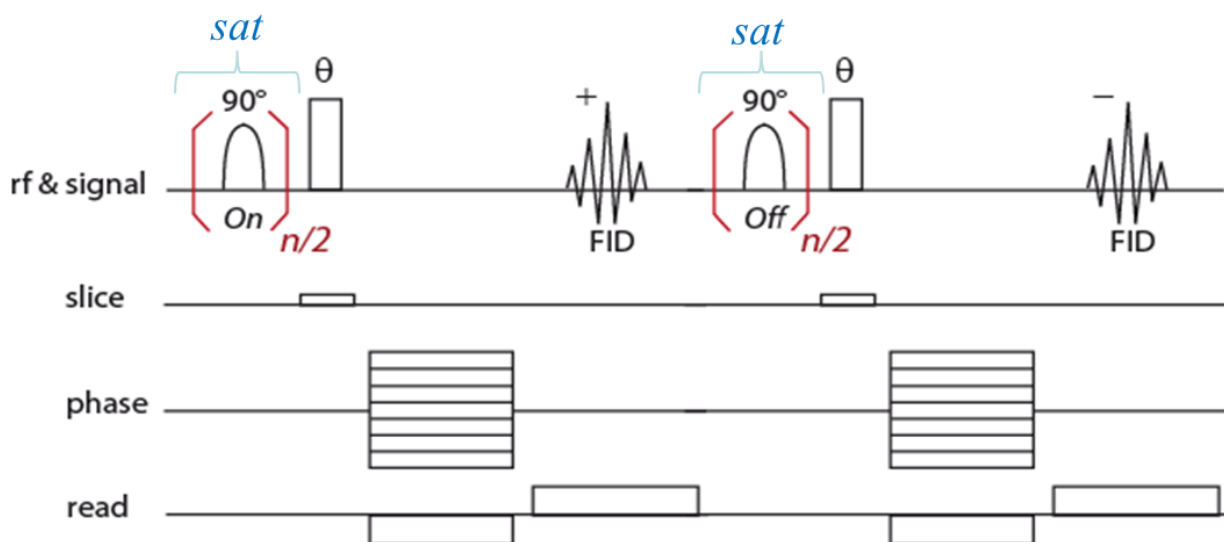


Figure 5-19 : Séquence HyperCEST-écho de gradient. Pour chaque valeur de gradient de phase une acquisition 'ON-resonance' puis une acquisition 'OFF-resonance' sont réalisées.

Les inconvénients de cette technique sur la détection directe pour l'imagerie sont les suivants.

Lors de l'obtention d'une image, la durée de saturation peut aller jusqu'à la dizaine de secondes. Cependant entre le début de la saturation et sa fin, il peut y avoir un phénomène de diffusion translationnelle qui donnera des signaux ailleurs qu'à la position initiale et donc une information spatiale erronée.

Par ailleurs l'échauffement important que peut engendrer les fortes radiofréquences mises en jeu peut ne pas être anodin dans certaines conditions. La longue saturation utilisée nécessitant de très forts dépôts radiofréquence, il faut considérer avec précaution l'échauffement qui est induit lors des expériences *in vivo*. Sur l'homme il n'est pas sûr que de telles impulsions de saturation puissent être envisagées telles quelles.

De plus l'inconvénient potentiel de cette technique par rapport à la détection directe lorsqu'il s'agit de multiplexage est le manque de sélectivité en fréquence : celle-ci est moins bonne pour une saturation que pour une impulsion.

Par contre l'HyperCEST possède un avantage important qui est la possibilité de sélectionner une tranche quelle que soit son épaisseur (mais attention la saturation est non sélective spatialement).

5.3.3.2. HyperCEST-EPI

Une séquence très efficace que nous avons installée et utilisée au laboratoire pour la localisation sensible de biosondes (voir chapitre 8) est la séquence d'HyperCEST-EPI décrite dans la figure 5-20.

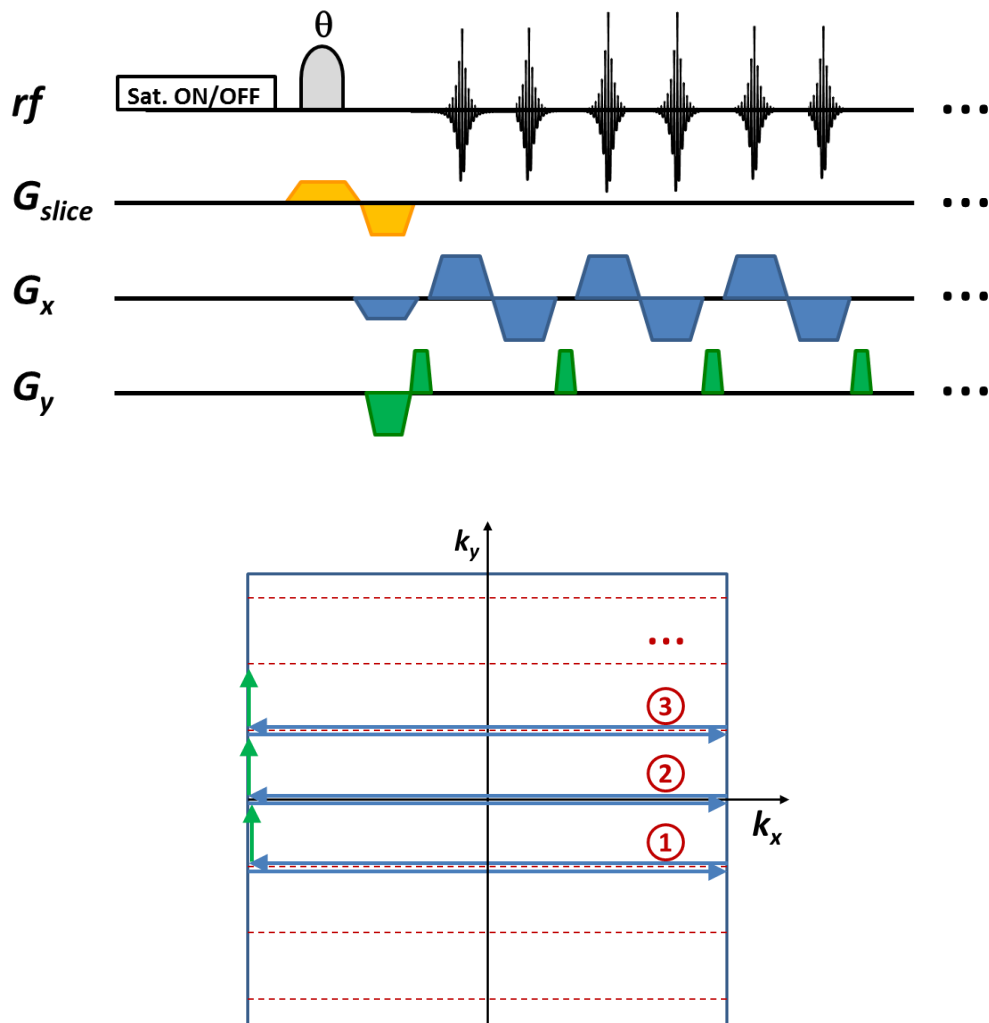


Figure 5-20 : Séquence d'HyperCEST-EPI²⁸ et balayage de l'espace des k en double échantillonnage.

Le premier avantage de cette séquence par rapport à l'HyperCEST-écho de gradient est qu'elle est plus rapide et qu'avec une seule impulsion on couvre tout l'espace des k . Ceci est possible uniquement pour des valeurs de T_2^* du xénon libre suffisamment grandes. L'implémentation que nous avons faite contient un double échantillonnage (observez la différence avec l'EPI décrit en figure 4-4), ce qui élimine de nombreux artefacts, et une accélération de Fourier dans la dimension de phase.

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés aux différentes séquences RMN utilisées pour la détection du xénon dans ces molécules hôtes après avoir fait le tour d'horizon sur les différentes structures pouvant encapsuler le xénon et possédant les propriétés requises pour l'approche de biosonde, qu'elles soient du point de vue thermodynamique ou cinétique (vitesse d'entrée/sortie du xénon). Une fois cette base posée, nous nous intéresserons dans le chapitre suivant à décrire les biosondes en elles-mêmes qui sont constituées par les cryptophanes sur lesquels les chimistes ont greffé des ligands pour la reconnaissance de récepteurs ou d'évènements biologiques d'intérêt.

REFERENCES

- (1) Huber, G.; Brotin, T.; Dubois, L.; Desvaux, H.; Dutasta, J.-P.; Berthault, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6239.
- (2) Mecozzi, S.; Rebek, J., Jr *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1016.
- (3) Lerouge, F.; Melnyk, O.; Durand, J.-O.; Raehm, L.; Berthault, P.; Huber, G.; Desvaux, H.; Constantinesco, A.; Choquet, P.; Detour, J.; Smâih, M. *J. Mater. Chem.* **2008**, *19*, 379.
- (4) Bartik, K.; Luhmer, M.; Heyes, S. J.; Ottinger, R.; Reisse, J. *JMRB* **1995**, *109*, 164.
- (5) Fukutomi, J.; Adachi, Y.; Kaneko, A.; Kimura, A.; Fujiwara, H. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2007**, *58*, 115.
- (6) El Haouaj, M.; Luhmer, M.; Ho Ko, Y.; Kim, K.; Bartik, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 804.
- (7) Brotin, T.; Dutasta, J.-P. *Chem. Rev* **2009**, *109*, 88.
- (8) Fairchild, R. M.; Joseph, A. I.; Holman, K. T.; Fogarty, H. A.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Boutin, C.; Huber, G.; Berthault, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15505.

- (9) Fogarty, H. A.; Berthault, P.; Brotin, T.; Huber, G.; Desvaux, H.; Dutasta, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10332.
- (10) Little, M.; Donkin, J.; Fisher, J.; Halcrow, M.; Loder, J.; Hardie, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1.
- (11) Berthault, P.; Desvaux, H.; Wendlinger, T.; Gyejacquot, M.; Stopin, A.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Boulard, Y. *Chem., a Eur. J.* **2010**, *16*, 12941.
- (12) Kotera, N.; Delacour, L.; Traoré, T.; Tassali, N.; Berthault, P.; Buisson, D.; Dognon, J.; Rousseau, B. *Org. Lett.* **2011**, *asap*.
- (13) Huber, G.; Beguin, L.; Desvaux, H.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Berthault, P. *J. Phys Chem. A* **2008**, *112*, 11363.
- (14) Miller, K. W.; Reo, N. V.; Schoot Uiterkamp, A. J. M.; Stengle, D. P.; Stengle, T. R.; Williamson, K. L. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1981**, *78*, 4946.
- (15) Navon, G.; Song, Y.-Q.; R^om, T.; Appelt, S.; Taylor, R. E.; Pines, A. *Science* **1996**, *271*, 1848.
- (16) Luhmer, M.; Goodson, B. M.; Song, Y.-Q.; Laws, D. D.; Kaiser, L.; Cyrier, M. C.; Pines, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3502.
- (17) Böhlen, J. M.; Burghardt, I.; Rey, M.; Bodenhausen, G. *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 183.
- (18) Berthault, P.; Desvaux, H.; Le Goff, G.; Pétro, M. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *314*, 52.
- (19) Desvaux, H.; Gautier, T.; Le Goff, G.; Pétro, M.; Berthault, P. *Eur. Phys. J. D* **2000**, *12*, 289.
- (20) Desvaux, H.; Berthault, P. *Prog. NMR Spectrosc.* **1999**, *35*, 295.
- (21) Kirchhoff, P.; Dutasta, J.-P.; Collet, A.; McCammon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 381.
- (22) Kirchhoff, P. D.; Bass, M. B.; Hanks, B. A.; Briggs, J. M.; Collet, A.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3237.
- (23) Berthault, P.; Huber, G.; Desvaux, H. *Prog. NMR Spectrosc.* **2009**, *55*, 35.
- (24) Schröder, L.; Lowery, T. J.; Hilty, C.; Wemmer, D. E.; Pines, A. *Science* **2006**, *314*, 446.
- (25) Zhou, J.; Van Zijl, P. *Prog. NMR Spectrosc.* **2006**, *48*, 109.
- (26) Aime, S.; Carrera, C.; Delli Castelli, D.; Geninatti Crich, S.; Terreno, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1813.
- (27) Berthault, P.; Bogaert-Buchmann, A.; Desvaux, H.; Huber, G.; Boulard, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16456.
- (28) Kunth, M.; Döpfert, J.; Witte, C.; Rossella, F.; Schröder, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, early view.

Chapitre 6

Biosondes utilisant la RMN du ^{129}Xe

Chapitre 6 – Biosondes utilisant la RMN du ^{129}Xe

6.1. Biosondes de la littérature

Le concept de biosonde où l'atome de xénon est encapsulé par une molécule-cage fonctionnalisée afin de cibler un récepteur biologique donné, a été introduit par Alexander Pines et son équipe en 2001. Ce principe a été démontré à partir du modèle d'interaction entre la biotine et l'avidine.¹ Le système biologique biotine-avidine a été choisi en raison de son importante constante d'association ($\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$). La molécule-cage choisie pour cette application est le cryptophane A. Un des six groupes méthoxy de ce cryptophane a été sélectivement remplacé par un groupe hydroxyl qui, converti en acide carboxylique, a été couplé à l'extrémité d'un petit peptide Cys-Arg-Lys-Arg permettant de gagner en solubilité dans l'eau. Le cryptophane-peptide résultant a été activé par la biotine pour obtenir la molécule finale. Sur le schéma de structure de cette biosonde (Figure 6-1) le cryptophane A et le peptide sont représentés en noir, le ligand biotine en rouge et la chaîne reliant le cryptophane au ligand en violet.

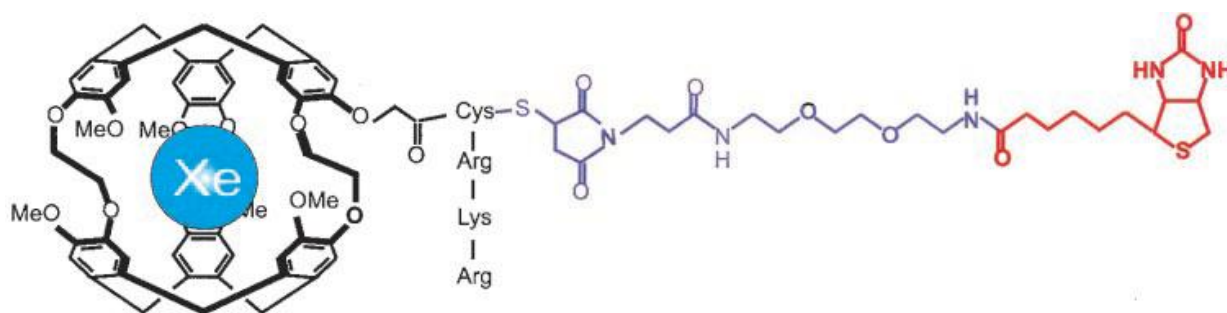


Figure 6-1 : Structure de la biosonde conçue à partir du cryptophane A et fonctionnalisée avec la biotine.¹

En 2004, deux équipes, celle du laboratoire et celle de Pines et al.,^{2,3} montrent que l'utilisation de mélange racémique donne naissance à une multiplication des pics de xénon encapsulé, ce qui en complique l'utilisation comme biosonde.

Ensuite l'équipe de Pines a étudié – en collaboration avec J.-P. Dutasta et T. Brotin, ENS Lyon - une série de biosondes toujours basées sur le modèle de l'interaction avidine-biotine mais avec différents ligands de longueur et flexibilité variables afin de tester leur potentiel.⁴ De nombreux paramètres tels que la vitesse d'entrée-sortie du xénon, la variabilité du déplacement chimique du xénon encapsulé et son temps de relaxation transversale ont été testés. Ces études ont permis de mettre notamment en évidence qu'un ligand trop court et trop peu flexible pourrait faire relaxer trop vite le xénon encapsulé lorsque la biosonde est liée à son récepteur, et donc conduire à des raies trop larges sur le spectre RMN pour être détectables à faible concentration.

En 2005-2006, ce modèle de biosonde biotine a été fixé sur un support solide de billes d'agaroses où l'avidine est immobilisée.^{5,6} Un montage a été réalisé pour créer un flux continu d'eau saturée en xénon hyperpolarisé sur le support solide.⁷ Le spectre RMN ^{129}Xe (Figure 6-2) montre 4 signaux dont un est caractéristique du xénon dissous dans l'eau à 192.5 ppm, un autre caractéristique du xénon dissous dans les billes d'agarose (193.6 ppm), un troisième correspond au xénon encapsulé dans la biosonde libre (65 ppm) et un à 0 ppm représente le xénon en phase gaz.

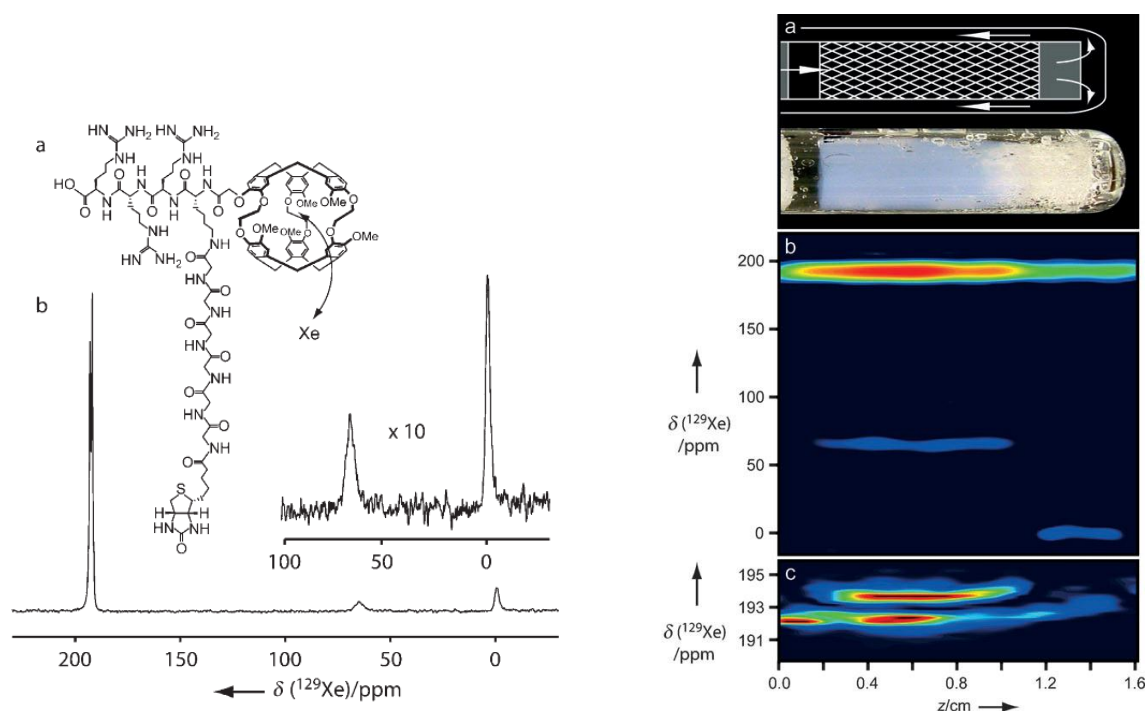


Figure 6-2 : Schéma de gauche : a) structure de la biosonde biotine ; b) spectre ^{129}Xe de la biosonde en présence d'avidine sur support de billes d'agarose. Sur les images de droite sont représentés en a) le schéma et la structure de l'échantillon de billes d'agaroses utilisé pour l'expérience. Les flèches sur le schéma représentent la direction du flux d'eau saturé en xénon; en b) image ^{129}Xe de la biosonde de xénon immobilisée. La dimension horizontale (en cm) correspond à celle de l'image en a. Celle-ci est réalisée en 135 min avec un champ de vue de 2 cm le long de la dimension z et une résolution de 1,2 cm. c) IRM ^{129}Xe dans la biosonde entre 191 et 195 ppm. Deux traces se distinguent : une pour le xénon dans les billes, l'autre pour le xénon dans l'eau.

Une imagerie spectroscopique présentée en figure 6-2 met en avant la distribution spatiale (le long du tube) et spectroscopique (en déplacement chimique) du xénon contenu dans les billes d'agarose et du xénon dissous. A 65,4 ppm, le profil s'étendant de 0,2 à 1,2 cm montre la distribution du xénon liée à l'avidine. Enfin à 0 ppm on peut observer l'image du xénon gaz localisé sur 0,2 cm de tube (entre 1,2 et 1,4 cm).

D'autres équipes ont utilisé le concept de biosonde pour différentes cibles biologiques. Le laboratoire, en partenariat avec les chimistes de l'ENS de Lyon, a envisagé une association biomoléculaire bénéficiant d'une plus faible constante d'affinité que le système avidine-biotine. La cible choisie a été la séquence oligonucléotidique suivante :

5'-CCC CAT GGC CCT CCC TTA TC-3'.⁶ L'objectif était de détecter ce brin d'ADN spécifique grâce à une biosonde constituée d'un cryptophane-A sur lequel est greffée la séquence du brin complémentaire. Pour un 20-mer l'hybridation a une constante d'affinité de 10^6 M^{-1} environ. La biosonde est composée de la forme énantiopure du cryptophane A (afin de s'affranchir d'un éclatement des pics de xénon encapsulé dû aux formes diastéréomériques), d'un espaceur constitué de 6 CH_2 , et du brin d'ADN complémentaire de celui de la cible à détecter (Figure 6-3).

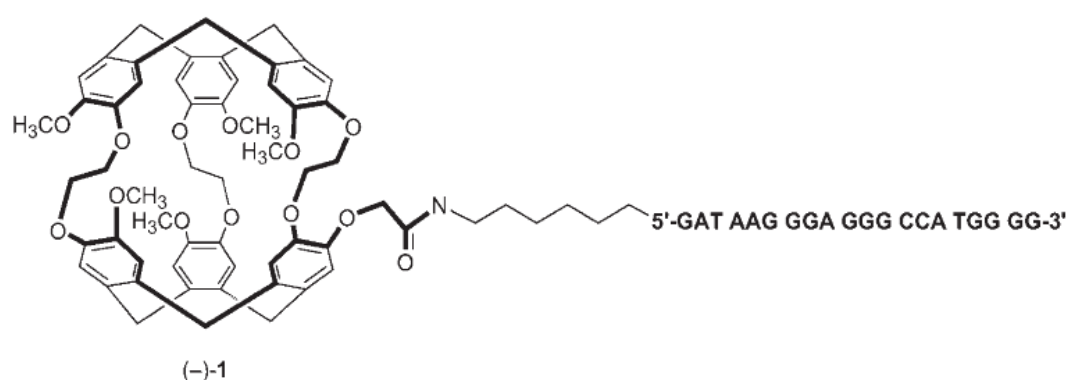


Figure 6-3 : Structure de la biosonde conçue pour la détection du brin d'ADN : 5'-CCC CAT GGC CCT CCC TTA TC-3'.

Trois échantillons ont été testés. La biosonde libre en solution aqueuse a constitué l'échantillon S1. Celle mise en présence du brin d'ADN complémentaire a formé l'échantillon S2 et celle mise en présence du brin non complémentaire, l'échantillon S3. Les résultats RMN ^{129}Xe obtenus sont présentés en figure 6-4.

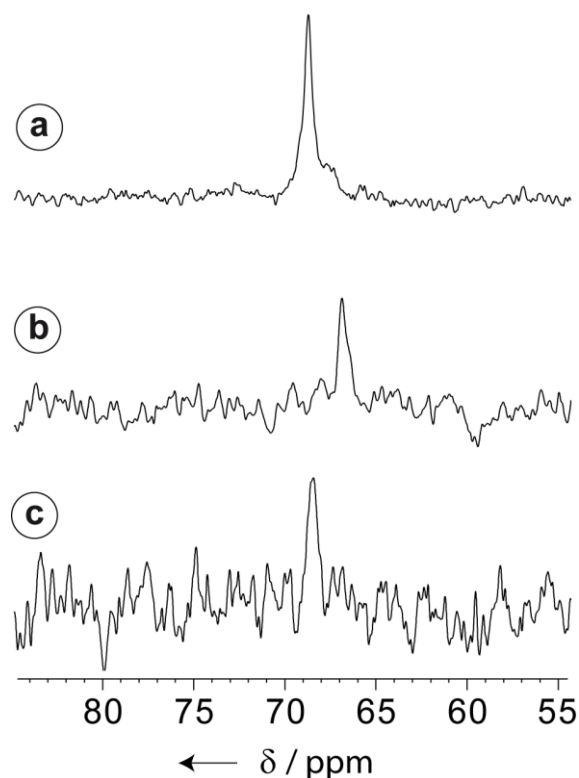


Figure 6-4 : Région à champ fort des spectres RMN ^{129}Xe réalisés à 310 K et 11.7 T en solution aqueuse pour l'échantillon S1 en a), l'échantillon S2 en b), et l'échantillons S3 en c). Les concentrations respectives de chaque échantillon sont : 2, 10 et 12 μM . Les valeurs de déplacements chimiques sont obtenues par rapport à la référence du signal de xénon dissous dans l'eau fixée à 190 ppm.

Le spectre a) relatif à S1 montre un signal à 69 ppm correspondant au déplacement chimique du xénon dans la biosonde libre. Le spectre b) relatif à S2 présente un écart de déplacement chimique à 67 ppm correspondant au xénon encapsulé dans la biosonde lorsque celle-ci est liée à sa cible (le brin d'ADN complémentaire). Enfin en c), le signal de xénon encapsulé dans la biosonde de l'échantillon S3, à 69 ppm, ne présente pas d'écart de déplacement chimique par rapport à la biosonde libre. Ces résultats mettent en évidence la spécificité et l'efficacité de cette approche en montrant une différence de déplacement chimique de 2 ppm entre la biosonde libre et la biosonde liée au brin d'ADN cible, ce qui est confortablement utilisable pour la reconnaissance du brin d'ADN complémentaire en solution faiblement concentrée (μM).

Entre 2006 et 2009 l'équipe de Dmochowski (Université de Pennsylvanie) a étendu la gamme d'applications biologiques des sondes à la détection de l'activité enzymatique.

Des biosondes ciblant l'activité d'enzymes telle la métalloprotéase MMP-7 ont été développées. Les protéases ont été choisies car elles constituent d'excellents indicateurs diagnostiques pour des cancers tels que celui du sein ou du colon. En effet celles-ci dégradent tous les éléments de la matrice extra-cellulaire ce qui dérègle de nombreux processus physiologiques et induit des événements pathologiques. De plus, l'intérêt de suivre l'activité catalytique d'une enzyme réside dans la sensibilité accrue apportée par le cycle enzymatique, ce qui permet de concentrer localement de forte densité de molécules hôtes du xénon près du récepteur biologique.

La biosonde d'intérêt est constituée d'une molécule-cage : le cryptophane A, d'un bras espaceur, et d'un substrat composé d'une séquence d'acides aminés (LWRSRK) reconnue spécifiquement par l'enzyme MMP-7 (Figure 6-5).

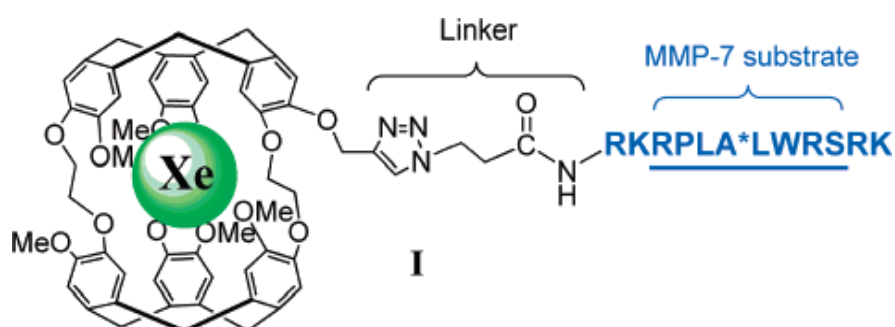


Figure 6-5 : Structure de la biosonde ^{129}Xe dessinée à la détection de l'enzyme MMP-7. En bleu, à droite de la figure est présenté le substrat MMP-7. L'astérisque désigne le site où l'enzyme est clivée.

Toujours dans le cadre de l'activité enzymatique, l'équipe de Dmochowski s'est intéressée à l'anhydrase carbonique humaine mise en jeu dans certains cancers.^{8,9} Deux des 7 isoenzymes ont été considérés : les anhydrases I et II. Les 3 biosondes synthétisées pour cette étude sont constituées d'un cryptophane, d'un bras espaceur et d'un motif arylsulfonamide qui va interagir avec les anhydrases. Ces 3 biosondes, C6B, C7B et C8B, ne diffèrent les unes les autres que par leur longueur de chaîne (Figure 6-6).

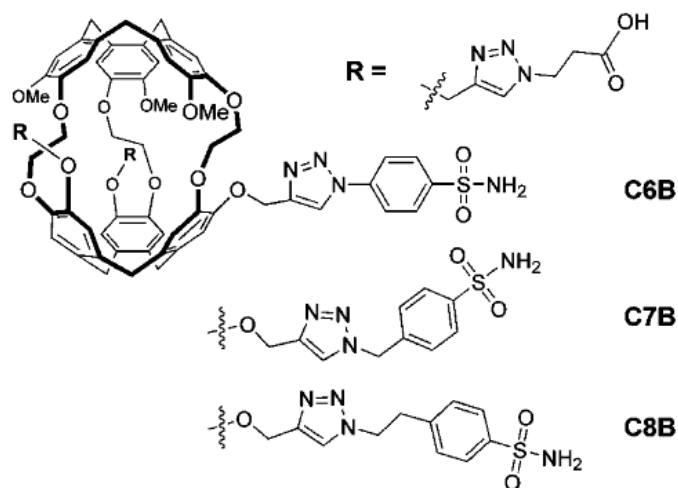


Figure 6-6 : Structure de la biosonde ^{129}Xe destinée à la détection de l'anhydrase carbonique I et de l'anhydrase carbonique II. Les 3 dérivés de cette biosonde C6B, C7B et C8B sont représentés respectivement de haut en bas. La biosonde C6B possède la longueur de bras espaceur la plus courte, C8B la plus longue et C6B celle de longueur intermédiaire.

Les résultats en RMN ^{129}Xe montrent d'une part que chacune de ces biosondes possède la capacité de distinguer l'anhydrase carbonique I de l'anhydrase carbonique II. D'autre part, en fonction de la biosonde utilisée C6B, C7B ou C8B, un écart de déplacement chimique compris entre 3 et 7.5 ppm entre le xénon dans la biosonde libre et le xénon dans la biosonde liée à l'anhydrase a été obtenu.

En 2009, un autre système biologique a été étudié par Freund et al. La biosonde développée a permis la détection du complexe formé par la protéine de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec son ligand.¹⁰ Les molécules CMH de classe II sont des molécules de surface cellulaire qui jouent un rôle immunitaire important. L'interaction détectée est celle du peptide hemagglutinine (HA) de séquence PKYVKQNTLKLAT avec l'antigène (HLA) DR1.

L'ensemble de ces résultats très encourageants ouvre la voie vers une imagerie du xénon 129 hyperpolarisé pour la détection sensible de pathologies telles que le cancer. Le point commun de toutes ces approches est de chercher à augmenter la densité locale de récepteurs de xénon et l'accessibilité du gaz à ces récepteurs, puisque la limitation est la sensibilité de détection. Ainsi, les auteurs ont privilégié soit des biosondes ciblant des

systèmes enzymatiques (jouant sur le cycle catalytique), soit des récepteurs de surface cellulaire (CMH), espérant profiter de l'internalisation des biosondes par endocytose. Ce dernier principe est celui que nous avons utilisé pour une biosonde des récepteurs transferrine, décrite dans la partie suivante.

6.2. Biosonde transferrine

En collaboration avec nos collègues chimistes de l'ENS Lyon et des biologistes du CEA, nous avons réalisé au laboratoire la première sonde pour la détection d'un événement biologique sur des cellules vivantes.¹¹ Si la preuve de concept a été réalisée avec succès sur des modèles biologiques simples profitant d'une grande affinité entre la sonde et la cible, il n'a jamais été répertorié d'essai sur des systèmes de cellules vivantes en suspension ou *in vivo*. En 2008 Dmochowski et collaborateurs avaient étudié l'internalisation cellulaire de cryptophanes fonctionnalisés mais aucun spectre ^{129}Xe démontrant cette internalisation n'avait été réalisé.¹²

Nous avons choisi de concevoir une biosonde ciblant les récepteurs de la transferrine. La transferrine est une protéine naturelle de 80 kDa dont le rôle consiste à internaliser le fer dans les cellules (Figure 6-7). Elle est d'un grand intérêt dans le domaine du ciblage de médicaments puisqu'elle est biodégradable, non toxique et non immunogénique. De plus, la cible biologique étant des récepteurs à la surface des cellules, l'accès du xénon est grandement facilité et augmenté. Cet accès est d'autant plus important que le nombre de récepteurs par cellule peut atteindre 10^5 pour certaines cellules eucaryotes (telles les cellules K562), ce qui accroît considérablement la densité de xénon et donc le signal RMN. Au départ de ce projet, nous ne savions pas si la présence d'ions Fe^{3+} paramagnétique poserait un problème en accélérant trop la relaxation du xénon. Or l'affinité de l'holo-transferrine étant 800 fois plus élevée que celle de l'apo-transferrine, il était primordial de travailler avec la forme holo. Une solution de secours utilisant les ions Ga^{3+} non paramagnétiques a été envisagée en cas de difficulté rencontrée avec les ions Fe^{3+} puisque

les premiers bénéficient également d'une affinité importante pour la transferrine.¹³ Finalement, nous n'avons pas eu besoin de recourir à cette solution.

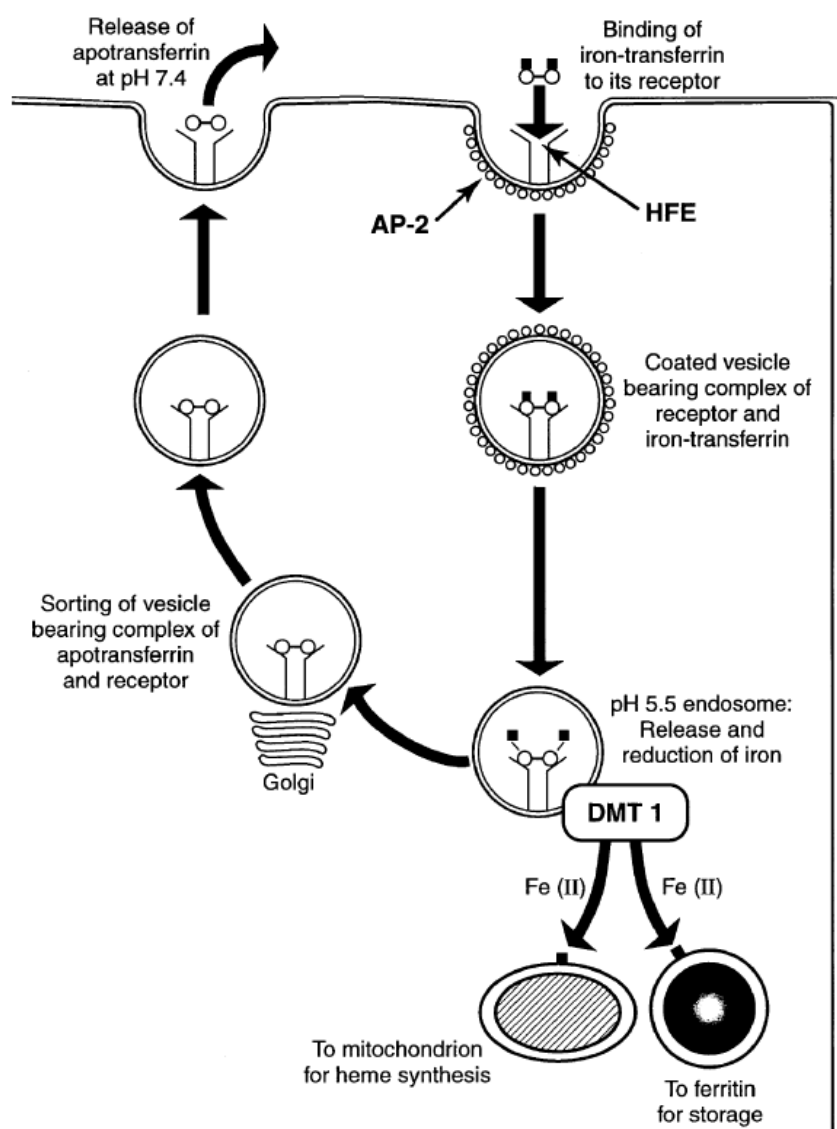


Figure 6-7 : Schéma du processus d'internalisation du fer dans les cellules.

L'idée a été de constituer une biosonde en greffant des cryptophanes à l'holo-transferrine, en cherchant évidemment à ne pas modifier son interaction avec les récepteurs cellulaires. L'interaction de la biosonde avec les récepteurs de la transferrine serait donc détectée grâce à la RMN du xénon-129 hyperpolarisé sur des cellules en suspension. Pour ce faire, le protocole développé au laboratoire a été le suivant. Le greffage non spécifique de systèmes hôtes du xénon sur les groupes amines (ϵ) des chaînes latérales des lysines a été

réalisé grâce à un cryptophane portant un espaceur polyéthylène glycol terminé par un ester activé (Figure 6-8). L'intérêt d'un marquage non spécifique est multiple : i) il y a possibilité de greffer plusieurs cryptophanes par molécule de transferrine (Tf), ce qui augmente encore la sensibilité de la mesure par RMN du xénon-129 hyperpolarisé. La transferrine possède 54 résidus Lysine, dont 23 sont accessibles car en surface de la protéine et éloignés du site actif. Par RMN du proton sur un spectromètre 700 MHz équipé d'une crysonde, nous avons vérifié qu'en dessous d'un rapport de 10 cryptophanes par molécule de Tf, la protéine restait repliée en solution ; ii) ce greffage non spécifique peut être réalisé sur n'importe quelle autre protéine pour des tests comparatifs d'activité.

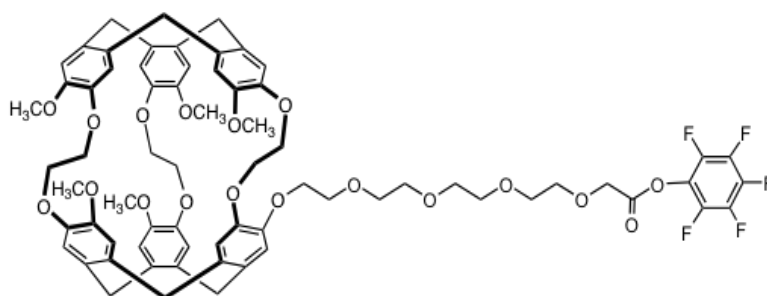


Figure 6-8 : Précurseur cryptophane pour la biosonde transferrine.

Pour cette étude, des cellules erythroleucémiques humaines K562 ont été choisies en raison de leur nombre très important de récepteurs Tf par cellule qui est de $1,6 \cdot 10^5$ et de $8 \cdot 10^5$ en comptant ceux internalisés ! Pour ce projet, 4 biosondes ont été conçues. La première notée **B1** (dont le spectre RMN est donné en figure 6-9) est une biosonde où 5 cryptophanes sont greffés statistiquement sur la protéine transferrine. La seconde **B2** possède une double modalité à la fois en RMN et en fluorescence. La fluorescence est rendue possible par le greffage additionnel d'une molécule de rhodamine (même type de greffage non spécifique). **B2** possède un rapport 2 :2 :1 pour le cryptophane, la sonde fluorescente et la protéine respectivement. Deux autres biosondes de contrôles, **B3** et **B4**, ont été synthétisées selon le même principe que **B1** et **B2** mais avec une protéine globulaire de taille proche (~67 kDa) : l'albumine de sérum bovin (BSA). La BSA a été choisie pour constituer les biosondes de contrôle car il n'y a pas de récepteur de cette protéine en surface des cellules K562.

La figure 6-9 présente le spectre RMN ^{129}Xe de la biosonde **B1** à une concentration de 1.3 μM dans l'eau avec un tampon phosphate salin (PBS), à 277 K et 11,7 T. Le pic de xénon encapsulé dans cette biosonde à environ 68,5 ppm est unique et relativement fin malgré le marquage non spécifique, ce qui est sans doute dû à la flexibilité et la longueur suffisante du bras espaceur du cryptophane.

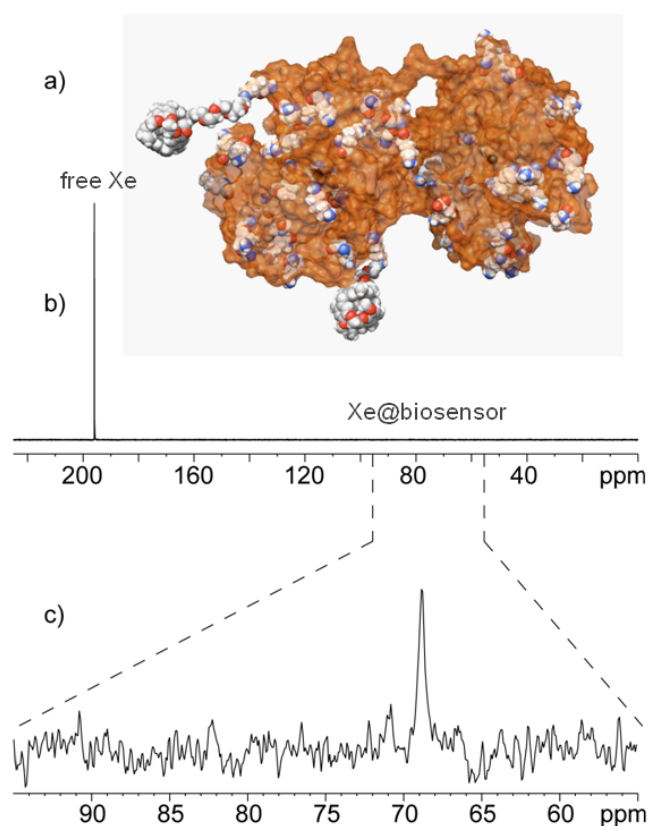


Figure 6-9 : a) Structure de la biosonde transferrine **B1**; b) Spectre RMN du ^{129}Xe hyperpolarisé obtenu en un scan pour 1.3 μM de biosonde **B1** dans l'eau tamponnée à 277 K et 11,7 T; c) Zoom de la région spectrale du xénon encapsulé dans les cryptophanes de la biosonde.

Pour étudier l'interaction de nos biosondes avec les cellules K562, la procédure suivante a été effectuée pour **B1-B4**. La démarche étant strictement identique pour toutes les biosondes, nous ne la détaillerons que pour **B1**.

140 millions de cellules K562 ont été incubées avec une concentration de 5 μ M d'une solution de **B1** à 37°C pendant 1 heure. Après centrifugation à 4°C, le surnageant a constitué l'échantillon **s_a**. Après deux lavages supplémentaires à cette même température, les cellules ont été isolées pour former l'échantillon **c_a**. En parallèle à la préparation de ces deux échantillons, 140 millions de cellules K562 ont été pré-traitées avec de la pronase, un mélange d'enzymes qui désactive la fonction des récepteurs de transferrine à la surface des cellules. En effectuant les mêmes manipulations que précédemment nous avons obtenu **s_b** et **c_b**.

Les échantillons **c_a** et **c_b** ont ensuite été comparés, en RMN du xénon 129 hyperpolarisé pour les échantillons issus de la biosonde **B1** et en microscopie de fluorescence pour les échantillons issus de **B2**. La comparaison a été également effectuée entre les surnageants **s_a** et **s_b** par RMN ^{129}Xe hyperpolarisé.

L'échange de la biosonde transferrine entre les compartiments intra et extra-cellulaires est régi par les lois de la thermodynamique. Le protocole que nous avons utilisé pour la préparation de nos échantillons nous a permis de ralentir cet échange en descendant la température à 4°C pour le rinçage et la conservation des cellules. De cette façon nous pouvons considérer que la fluorescence et les spectres RMN réalisés reflètent la distribution de la biosonde à la fin de l'étape d'incubation.

La figure 6-10 montre les résultats de microscopie et de fluorescence des échantillons **c_a** et **c_b**. Après incubation des cellules avec **B2**, l'internalisation de la biosonde est clairement visible. La présence de spots verts sur la surface cellulaire indique également la présence de **B2** à l'intérieur de la membrane plasmique.

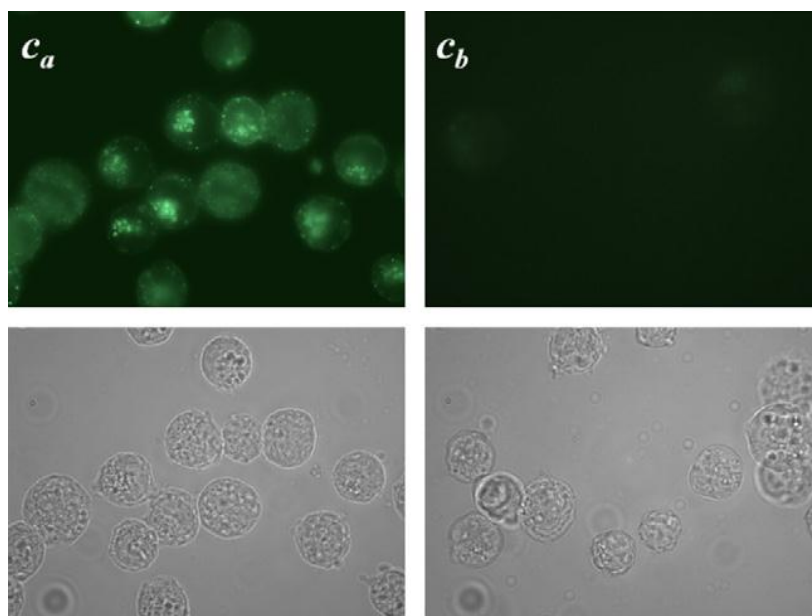


Figure 6-10 : Images de fluorescence (en haut) et microscopique (en bas) des cellules incubées avec la biosonde **B2**. Les images de gauche sont celles des cellules traitées sans pronase et celles de droite celles traitées avec la pronase.

La figure 6-11 présente dans un premier temps, les spectres RMN ^{129}Xe (de la région comprise entre 55 et 95 ppm correspondant à la région du xénon encapsulé dans la biosonde) de l'échantillon de cellules incubées avec la biosonde **B1**, et de l'échantillon de surnageant correspondant. Le spectre de l'échantillon **c_a** révèle 2 pics de xénon encapsulé. Le signal à 68,5 ppm est celui obtenu en figure 6-9 correspondant à la biosonde **B1**. Le second pic, plus large, à 79 ppm, est identifié grâce à des estimations sur le nombre de cellules présentes en solution et le nombre de récepteurs transferrine par cellule. Ces estimations nous permettent de dire que ce pic ne peut pas être celui du xénon dans la biosonde lié à un récepteur transferrine. Si cela avait été le cas, son intensité aurait dû être bien plus faible. De plus, Meldrum et al. ont démontré qu'une différence de l'ordre de 10 ppm peut se produire entre le xénon dans le cryptophane en phase aqueuse et le xénon dans le cryptophane en phase lipidique.¹⁴ Ceci confirme que le pic à 79 ppm correspond au xénon encapsulé dans la biosonde qui se trouve elle-même dans la membrane cellulaire, et le pic à 69 ppm celui du xénon dans la biosonde située dans le compartiment aqueux intracellulaire ou libre en solution.

Le spectre du lot **c_b** (pré-incubé avec la pronase) de la figure 6-11 ne montre aucun signal net ce qui est en parfaite adéquation avec les résultats de fluorescence de la figure 6-

10. La ressemblance entre les spectres xénon des échantillons s_a et s_b assure que ces solutions ne contiennent que la biosonde en solution aqueuse.

La comparaison de l'intégrale des signaux du xénon encapsulé dans les cryptophanes des biosondes **B1** (avec la transferrine) et **B3** (avec la BSA) montre que le rapport composante aqueuse sur composante lipidique est en faveur de la première biosonde (Table 6-1).

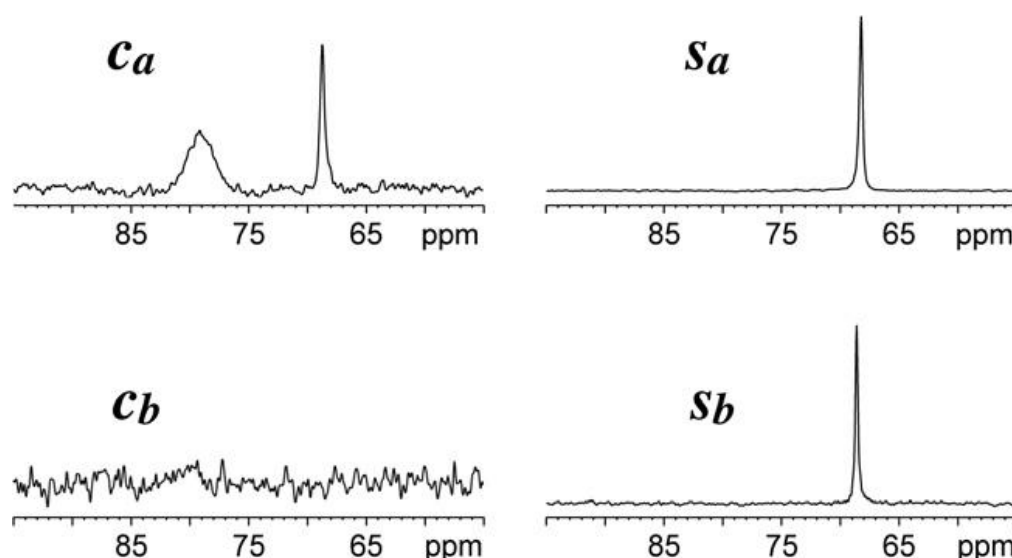


Figure 6-11 : Spectres RMN ^{129}Xe obtenus avec une excitation sélective dans la région spectrale du Xe@cryptophane à 293 K et 11,7 T. En haut à gauche est représenté le spectre de l'échantillon c_a où les cellules K562 sont incubées en présence de la biosonde **B1** pendant 1h à 310 K. En haut à droite est présenté le spectre du surnageant correspondant. Le spectre de l'échantillon c_b , de cellules K562 préalablement traitées à la pronase avant d'être incubées avec la biosonde **B1** pendant 1h à 310 K, est donné en bas à gauche. En bas à droite, figure le spectre du surnageant correspondant.

	Xe@crypto_lipid	Xe@crypto_aq
Tf	1	0.59
BSA	0.93	0.26

Table 6-1 : Intégrale des signaux à 79 et 69 ppm sur les spectres RMN ^{129}Xe des échantillons de cellules avec la transferrine et l'albumine de sérum bovin. Première ligne : sonde **B1** ; deuxième ligne : sonde **B3**.

L'ensemble de ces expériences met en parallèle la nette différence qui existe entre les spectres RMN ^{129}Xe quand la solution de biosonde **B1** est mise en présence de cellules traitées et non traitées par la pronase. Ceci révèle que les récepteurs transferrine sont nécessaires pour une interaction forte entre la biosonde et les cellules.

D'autres expériences ont été réalisées pour étudier la spécificité de la biosonde. Ces expériences mettent en jeu les biosondes non spécifiques à la transferrine **B3** et **B4** construites à partir de la BSA. Nous avons suivi le même protocole pour obtenir les échantillons de cellules et de surnageant c_c et s_c issus de **B4**. Les résultats présentés en figure 6-12 montrent que l'image de microscopie par fluorescence de **B4** possède bien moins de spots lumineux (à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule) que la biosonde **B2**, ce qui est en accord avec le fait que les cellules K562 utilisées ne possèdent pas de récepteurs spécifiques pour la BSA. Par contre le spectre RMN ^{129}Xe de la biosonde **B3** (Figure 6-12) présente encore deux signaux, mais avec une composante lipidique (pic à 79 ppm) plus importante que la composante aqueuse (Table 6-1).

Ces résultats mettent en évidence l'interaction non spécifique des biosondes **B3** et **B1**. Une explication peut être trouvée dans l'hydrophobie du cryptophane qui attirerait les biosondes dans la membrane cellulaire.

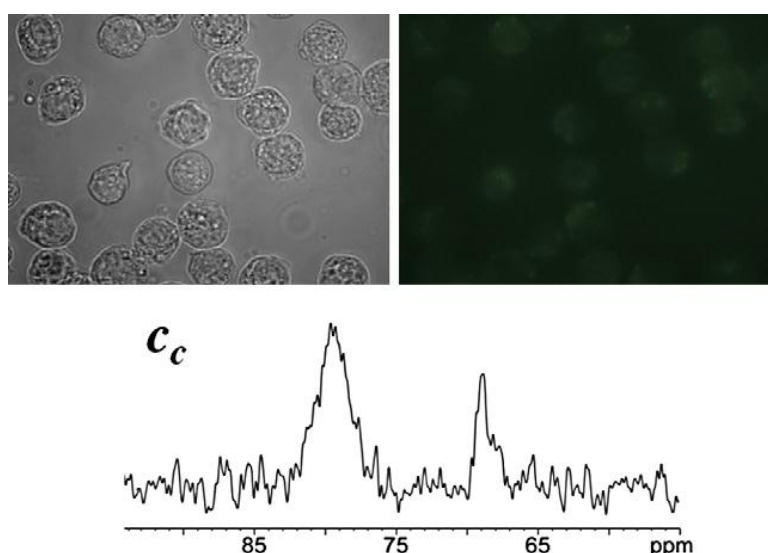


Figure 6-12: Image de microscopie de la biosonde **B4** incubée avec les cellules en haut à gauche et de fluorescence en haut à droite. En bas : spectre RMN ^{129}Xe de la biosonde **B3** incubée avec les cellules (région à champ fort).

Cette hypothèse a été vérifiée avec une expérience supplémentaire pour laquelle deux nouvelles structures à base de transferrine ont été construites. Dans la première, la sonde de fluorescence a été greffée sur l'apo-transferrine (à raison de 2 sondes par protéine). Dans la seconde, la sonde de fluorescence et le cryptophane ont été greffés sur l'apo-transferrine dans un rapport 2 : 2 par protéine. Ces structures ont été introduites dans une solution contenant des vésicules unilamellaires géantes (GUV). Les comparaisons des images de microscopie et de fluorescence montrent de grandes différences (Figure 6-13). En fluorescence une image plutôt diffuse a été observée dans le cas de la première structure, tandis que la localisation de la seconde (biosonde comportant des cryptophanes) dans la bicouche lipidique de la vésicule est clairement visible. Cette interaction vraisemblablement due à la présence du cryptophane, montre que le caractère hydrophobe de la molécule-cage induit une interaction non spécifique avec les cellules via leur membrane.

En résumé, ces travaux constituent la première détection par RMN du xénon hyperpolarisé de l'internalisation d'une biosonde dans des cellules vivantes. La partie cryptophane semble attirer en grande partie la biosonde dans la membrane lipidique. Pour éviter ce problème conduisant à un manque de spécificité dans l'interaction – ainsi qu'il a pu être montré avec la biosonde BSA - il sera nécessaire dans les prochaines études de disposer de cryptophanes plus hydrophiles (par exemple où les cycles aromatiques sont substitués avec des groupements de type polyéthylène glycol).

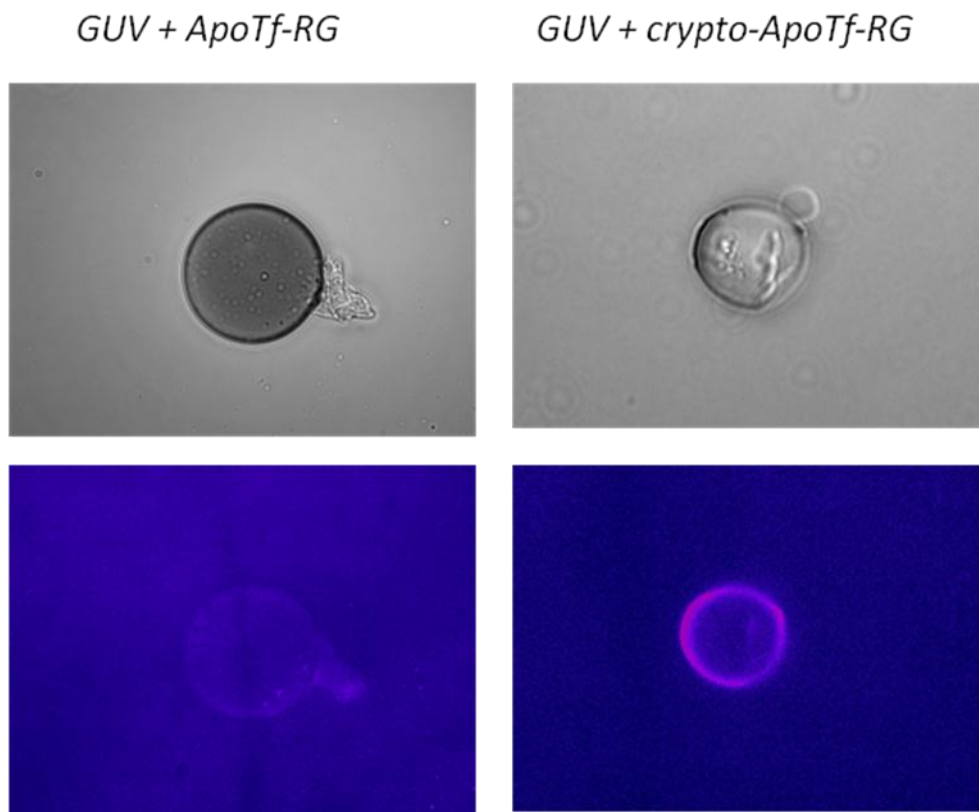


Figure 6-13: Images microscopiques (en haut) et de fluorescence (en bas) de vésicules unilamellaires géantes (GUV) obtenues après incubation avec les constructions cryptophane/vert de rhodamine/apo-transferrine. A gauche, la transferrine est uniquement marquée avec la sonde fluorescente. A droite la transferrine est marquée avec la sonde fluorescente et le cryptophane. RG = vert de rhodamine.

REFERENCES

- (1) Spence, M. M.; Rubin, S. M.; Dimitrov, I. E.; Ruiz, E. J.; Wemmer, D. E.; Pines, A.; Qin Yao, S.; Tian, F.; Schultz, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10654.
- (2) Huber, J. G.; Dubois, L.; Desvaux, H.; Dutasta, J.; Brotin, T.; Berthault, P. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 9608.
- (3) Spence, M.; Ruiz, E.; Rubin, S.; Lowery, T.; Winssinger, N.; Schultz, P.; Wemmer, D.; Pines, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15287.
- (4) Lowery, T. J.; Garcia, S.; Chavez, L.; Ruiz, E. J.; Wu, T.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; King, D. S.; Schultz, P. G.; Pines, A.; Wemmer, D. E. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 65.
- (5) Han, S.-I.; Garcia, S.; Lowery, T. J.; Ruiz, E. J.; Seeley, J. A.; Chavez, L.; King, D. S.; Wemmer, D. E.; Pines, A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4008.
- (6) Roy, V.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Charles, M.-H.; Delair, T.; Mallet, F.; Huber, G.; Desvaux, H.; Boulard, Y.; Berthault, P. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2082.
- (7) Hilty, C.; Lowery, T. J.; Wemmer, D. E.; Pines, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 70.
- (8) Aaron, J. A.; Chambers, J. M.; Jude, K. M.; Di costanzo, L.; Dmochowski, I. J.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6942.
- (9) Chambers, J. M.; Hill, P. A.; Aaron, J. A.; Han, Z.; Christianson, D. W.; Kuzma, N. N.; Dmochowski, I. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 563.
- (10) Schlundt, A.; Kilian, W.; Beyermann, M.; Sticht, J.; Günther, S.; Höpner, S.; Falk, K.; Roetzschke, O.; Mitschang, L.; Freund, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 1.
- (11) Boutin, C.; Stopin, A.; Lenda, F.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Jamin, N.; Sanson, A.; Boulard, Y.; Leteurtre, F.; Huber, G.; Bogaert-Buchmann, A.; Tassali, N.; Desvaux, H.; Carrière, M.; Berthault, P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 4135.
- (12) Seward, G. K.; Wei, Q.; Dmochowski, I. J. *Conj. Chem.* **2008**, *19*, 2129.
- (13) Sun, Y.; Gu, L.; Tong, X.; Bai, S.; Ichikawa, S.; Furusaki, S. *Biotechnol. prog.* **1999**, *15*, 506.
- (14) Meldrum, T.; Schröder, L.; Denger, P.; Wemmer, D. E.; Pines, A. *J. Magn. Reson.* **2010**, *205*, 242.

Chapitre 7

Sonde IRM à base de xénon
hyperpolarisé pour la
détection d'ions métalliques

Chapitre 7 – Sonde IRM à base de xénon hyperpolarisé pour la détection d'ions métalliques

7.1. Objectifs

Certains dications tels que le zinc, le calcium, et le magnésium jouent des rôles fondamentaux dans l'organisme.^{1,2} Nécessaire dans plus de 200 réactions chimiques, le zinc par exemple intervient notamment dans la synthèse et la structure de certaines protéines. Des réserves de cet ion sont également indispensables pour le bon fonctionnement d'organes tels que le cerveau, la rétine, le pancréas et la prostate. Ainsi un grand nombre de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, le diabète et certains cancers, sont liées au manque ou à l'excès de zinc.^{3,4,5,6} Sa détection et son dosage sont donc importants pour le diagnostic et le suivi de ces pathologies. A ce jour, seules deux techniques non invasives permettent l'étude et le suivi en temps réel de la distribution des ions métalliques dans les différents tissus du corps humain : l'imagerie optique à l'aide de sondes fluorescentes et l'imagerie par résonance magnétique utilisant des agents de contrastes vectorisés tels que des chélates de gadolinium. Cependant les méthodes optiques souffrent d'un faible pouvoir de pénétration⁷ et l'IRM du proton utilisant des agents de contrastes reste limitée par son manque de sensibilité.^{8,9,10,11,12,13,14} Par exemple, à ce jour la limite de détection du zinc par IRM est comprise entre 30 et 100 μM ¹⁰ alors que la concentration totale du zinc libre dans le sang est de 20 μM . L'alternative que nous proposons pour pallier cette faible sensibilité de détection est d'utiliser une sonde à base de xénon hyperpolarisé. Le système moléculaire souhaité doit être à la fois capable d'encapsuler le gaz rare et être fonctionnalisable avec une 'antenne de reconnaissance' capable de complexer les ions. Ainsi, d'après nos calculs et expériences précédentes, le seuil de détection des ions métalliques pourrait atteindre le μM voire le nM.

7.2. Description de la sonde

Nous visons une sonde activable par la présence d'ions métalliques en solution, c'est-à-dire pour laquelle le déplacement chimique du xénon encapsulé varie significativement quand les dications d'intérêt y sont liés. Cette sonde est constituée de 3 éléments : le système hôte du xénon, l'espaceur, et l'antenne destinée à chélater les ions métalliques (Figure 7-1).

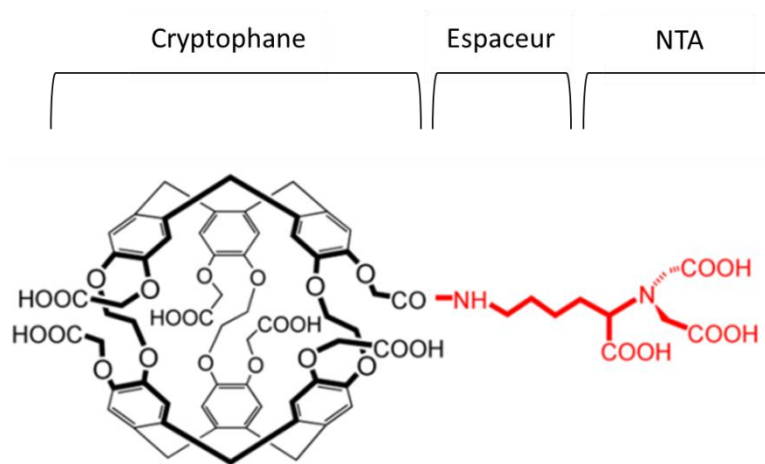


Figure 7-1 : Structure de la biosonde ^{129}Xe destinée à chélater les dications métalliques.

La molécule-cage choisie pour encapsuler le xénon est le cryptophane-222 hexa-carboxylate. Cette molécule aromatique de départ, synthétisée par nos collègues de l'ENS Lyon,¹⁵ a été choisie en raison de sa grande affinité pour le xénon ($\sim 6000 \text{ M}^{-1}$)^{16,17} et de sa bonne solubilité dans l'eau.¹⁸ De plus, la dynamique d'entrée-sortie du gaz rare dans l'eau, de l'ordre de 100 Hz à température ambiante, permet un rechargement continu de la cavité de la molécule-cage en xénon hyperpolarisé. Ce cryptophane hexa-carboxylate a précédemment pu être utilisé en tant que sonde de pH,¹⁶ mais est faiblement soluble à pH inférieur à 4 (le pKa du groupement carboxylate est de 4,7). En greffant un acide aminopolycarboxylique tel que l'acide nitrilotriacétique (NTA) sur le cryptophane, la biosonde devient très soluble dans l'eau quel que soit le pH (synthèse réalisée par les chimistes de l'IBITEC-S du CEA de Saclay).

Un seul des six groupements carboxylates a été activé par une tête NTA en utilisant une estérification avec le N-hydroxysuccinimide. Cette tête NTA qui possède un carbone asymétrique a été obtenue à partir de l'acide aminé L-Lysine.¹⁹ Les pKa des 3 groupements COOH de la molécule NTA sont de 3,03, 3,07 et 10. C'est la forme déprotonée de l'acide qui permet à la tête NTA de complexer les cations métalliques. Les constantes d'affinité de la tête NTA pour les ions tels que Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} sont notées dans le tableau suivant :²⁰

Ion métallique	NTA (log K_1)
Zn^{2+}	10,4
Ca^{2+}	6,4
Cd^{2+}	9,5
Pb^{2+}	11,8
Co^{2+}	10,6
Ni^{2+}	11,3
Cu^{2+}	12,7
Mg^{2+}	5,4
Mn^{2+}	7,4

Table 7-1 : Constantes d'affinité de différents ions métalliques avec la tête NTA à 293K.²⁰

Enfin, l'espaceur qui lie les 2 entités (le cryptophane et la tête NTA) contient une liaison amide puis 4 groupements CH_2 . Cette chaîne carbonée est suffisamment courte pour rendre la partie chélatant les ions proche du xénon encapsulé dans le cryptophane.

L'utilisation de cette sonde dans sa forme racémique nous conduit à deux formes diastéréoisomériques dues à l'hélicité de la liaison joignant les deux parties cyclotrивeratrylènes du cryptophane, et du site asymétrique de l'espaceur. Les deux diastéréoisomères obtenus seront notés par la suite **1P** et **1M** respectivement. Les

expériences de RMN ^{129}Xe nous ont montré que la constante d'affinité du gaz rare pour ces cages est voisine de celle du cryptophane hexa-carboxylate d'origine.

La première application de cette biosonde xénon est celle de la détection des ions Zn^{2+} .

7.3. Détection des ions Zn^{2+}

7.3.1. Préparation des échantillons

Les expériences ont été conduites à pH neutre, proche des conditions physiologiques, et en milieu aqueux tamponné afin de différencier les variations des déplacements chimiques du xénon encapsulé dues à un effet de complexation de l'ion par la sonde de celles dues à un effet de pH.

Le choix du tampon s'est porté dans un premier temps sur le tampon phosphate d'ammonium (noté PBS), exempt d'autres ions, qui nous a permis d'obtenir un pH de 7,4. A 293 K l'affinité de la tête NTA pour les ions Zn^{2+} est telle que $\log K = 10,4$ (Table 7-1).²⁰ La sonde a été étudiée à 293 K à une concentration de 426 μM (environ 0,3 mg de biosonde repris dans 500 μL d'eau tamponnée).

7.3.2. Résultats et discussion

7.3.2.1. Spectroscopie

A 293 K et à pH neutre (pH auquel nous resterons dans la suite de notre étude) et en l'absence de cations, le spectre RMN ^{129}Xe de la figure 7-2 montre un signal à 196 ppm dû au xénon dissous libre et un signal à 65,6 ppm représentatif du xénon encapsulé (1^{er} spectre en bas de la figure 7-2). Le fait qu'un seul signal soit détectable en l'absence d'ion, malgré la présence des 2 diastéréoisomères, doit être dû à l'éloignement du carbone asymétrique tant

que la tête NTA est libre et donc flexible. A cette distance le xénon encapsulé ne voit pas de différence entre les 2 formes.

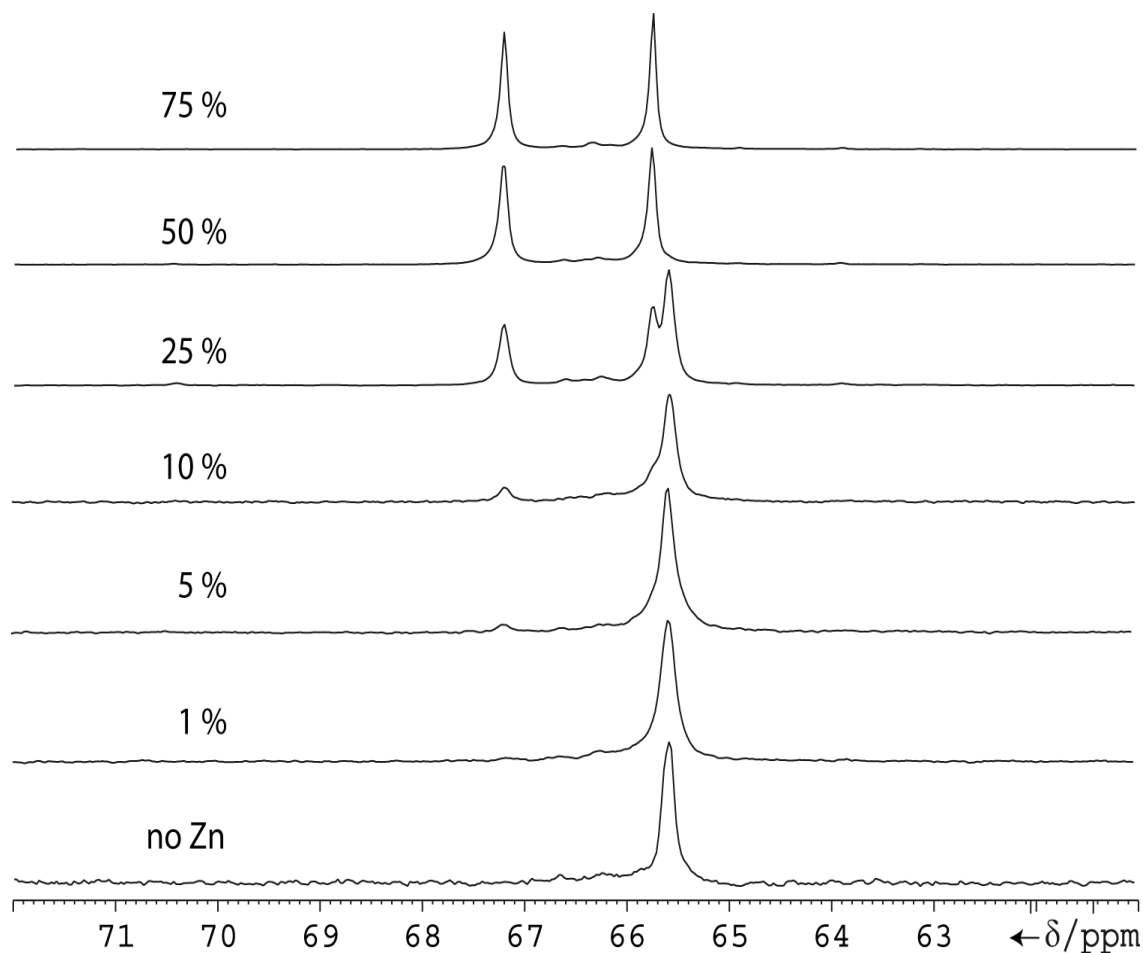


Figure 7-2 : Spectres RMN ^{129}Xe obtenus en 1 scan avec 426 μM de sonde racémique (**1P** + **1M**) et en présence de différentes concentrations d'ions Zn^{2+} . Les expériences ont été réalisées dans un tampon PBS deutéré à pH 7,4 à 293 K et 11,7 T.

Quand des ions Zn^{2+} sont ajoutés en solution, l'intensité du signal de xénon encapsulé dans la sonde libre diminue alors que deux signaux apparaissent à 65,75 ppm et 67,20 ppm. Une saturation est néanmoins observée à partir d'un rapport de concentration de 50 % en zinc par rapport à la biosonde (Figure 7-2).

L'apparition de ces deux pics d'intensités égales doit vraisemblablement être due à la chélation des ions Zn^{2+} par la tête NTA. En effet la chélation de l'ion est susceptible de modifier non seulement la densité électronique au voisinage de la cavité et donc le

déplacement chimique du xénon encapsulé, mais aussi la conformation de la sonde. La première hypothèse expliquant l'apparition de 2 pics suite à l'ajout de zinc en solution repose sur la perte de flexibilité du bras lors de la complexation du zinc par la tête NTA. On suppose que le carbone asymétrique du bras espaceur a ainsi été rapproché du xénon qui a donc pu distinguer les deux formes diastéréomériques.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, une synthèse énantiosélective du cryptophane-222-hexacarboxylate a été réalisée par les chimistes de l'ENS de Lyon.²¹ Les spectres ^{129}Xe obtenus indépendamment pour les cryptophanes énantiopurs **1P** et **1M** montrent chacun un signal unique en présence d'ions Zn^{2+} en présence de 50% de zinc (Figure 7-3). Le déplacement chimique de chaque pic correspond à celui d'un des signaux obtenus avec le mélange racémique. Le spectre ^{129}Xe du diastéréoisomère **1P** présente un signal à 65.75 ppm correspondant au signal de xénon encapsulé dans la biosonde racémique le plus décalé en fréquence vers les champs forts. Le spectre ^{129}Xe du diastéréoisomère **1M** révèle un signal à 67.2 ppm correspondant au second pic du xénon encapsulé dans la biosonde racémique.

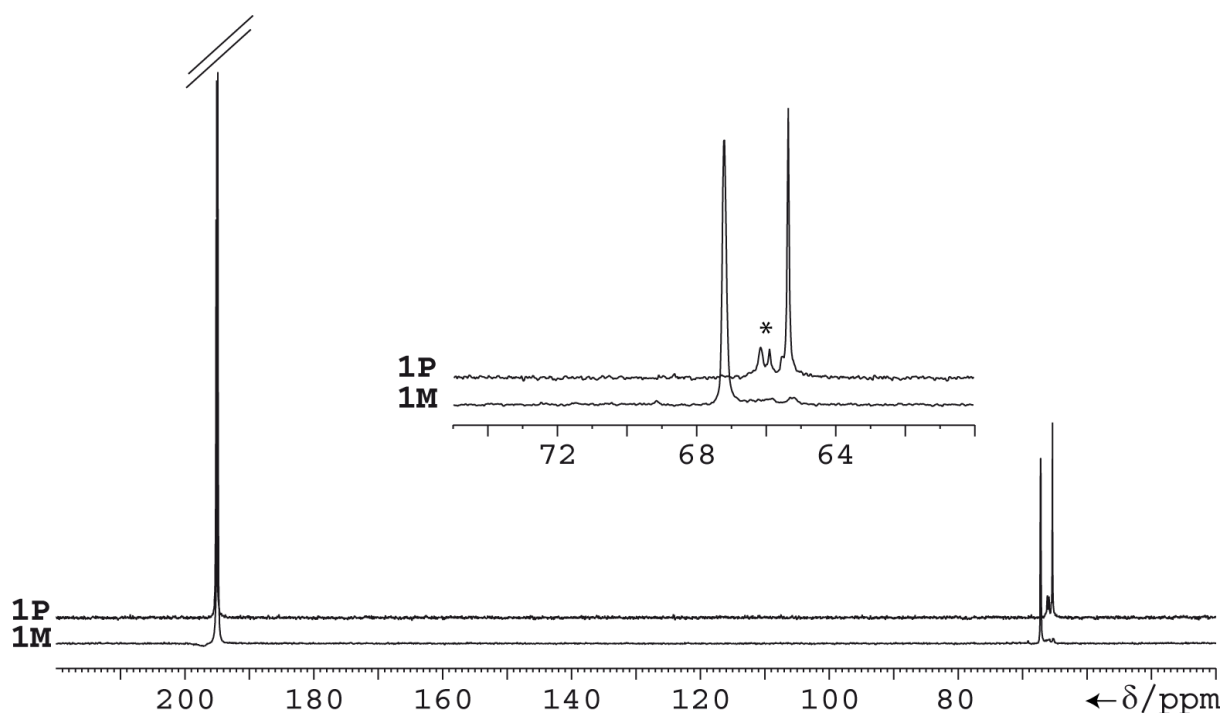


Figure 7-3 : Spectres RMN ^{129}Xe des deux diastéréoisomères **1P** et **1M** en présence de 50% de Zn^{2+} . L'astérisque représente des formes minoritaires de cryptophane.

Ces résultats confirment l'hypothèse faite sur la diastéréoisométrie et démontrent que l'utilisation d'un cryptophane énantipur rend possible la détection du dication métallique avec un signal unique. Un autre résultat important est l'écart de déplacement chimique de 1.7 ppm obtenu entre le signal de xénon encapsulé dans la biosonde libre et celui du xénon encapsulé dans la biosonde énantipure **1M** liée aux ions Zn^{2+} . Celui-ci est significatif et permet d'envisager des expériences d'IRM.

Cependant notre première hypothèse sur le repliement du bras ne permet pas d'expliquer la valeur de saturation obtenue. Une seconde hypothèse basée sur un phénomène de dimérisation où deux molécules sondes sont nécessaires pour complexer un ion Zn^{2+} pourrait expliquer cette saturation à 50%.

7.3.2.2. Diffusion

Pour vérifier cette hypothèse de dimérisation, des expériences de diffusion translationnelle ^1H ont été réalisées en présence et en l'absence d'ions Zn^{2+} .

La mesure du coefficient de diffusion translationnelle par RMN est une méthode d'analyse qui peut permettre simultanément : i) la détermination des formes et volumes des molécules ou agrégats présents dans un mélange et ii) l'identification du nombre de composants moléculaires d'une solution.

Le principe de la mesure de la diffusion par RMN repose classiquement sur une séquence d'écho de spin utilisant des gradients de champ magnétique statique (Figure 7-4). Dans cette expérience, l'aimantation, défocalisée par un premier gradient G, est refocalisée par un second gradient G d'amplitude identique. Si les particules n'ont pas diffusé entre l'application des 2 gradients, le signal détecté est alors d'amplitude maximale. Mais dès qu'il y a changement de position des particules (individuellement) selon l'axe du gradient, la refocalisation des vecteurs aimantation n'est plus complète.

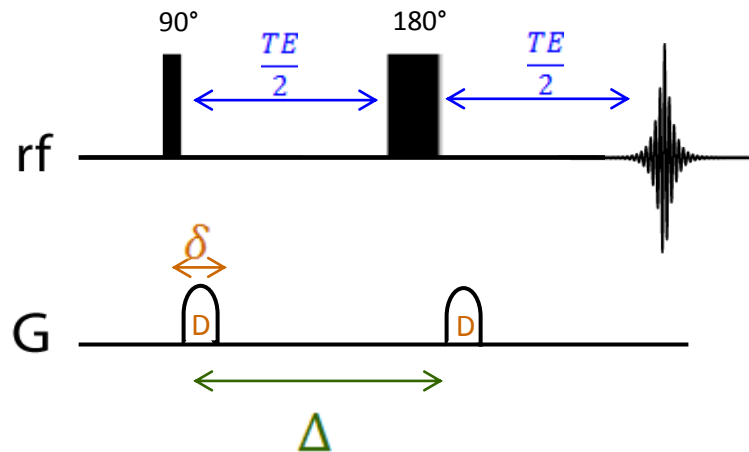


Figure 7-4 : Séquence de mesure de diffusion par écho de spin (SE). Le premier gradient est un gradient d’encodage, le second un gradient de décodage. δ représente la durée des gradients et Δ le temps entre l’application des deux gradients.

Les impulsions de gradients de champ statique représentent donc une très bonne méthode pour accéder à la diffusion translationnelle d’une molécule et à son coefficient de diffusion D . Les étapes permettant d’accéder à la valeur de ce coefficient sont les suivantes.

Soit $\langle \Delta z \rangle$ le déplacement moyen d’une particule suivant un axe z tel que : $\langle \Delta z \rangle = z_i - z_f$ avec z_i la position de la particule au moment où le gradient d’encodage est appliqué et z_f la position de la particule après l’application du gradient de refocalisation. On a alors :

$$\langle \Delta z \rangle = \sqrt{2D\Delta}$$

Où Δ est le délai entre les 2 gradients.

Dans une expérience d’écho de spin simple ou stimulé utilisé pour la diffusion (Figures 7-4 et 7-5) on fait varier l’amplitude G ou la durée δ des gradients. Le rapport des amplitudes des signaux en présence ($M(\delta, G)$) et en absence (M_0) de gradient obéit à la relation :

$$\frac{M(\delta, G)}{M_0} = e^{-\gamma^2 G^2 D \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right)}$$

Ainsi, si l'on fait le choix de faire varier G , en traçant $\ln(M/M_0)$ en fonction de G^2 et en ajustant les points expérimentaux par une droite (de pente $-\gamma^2 D \delta^2 (\Delta - \delta/3)$) on accède au coefficient D .

La première séquence proposée par Stejskal et Tanner (représentée sur la figure 7-4) employait un écho de spin simple (Gradient-Délai-180°-Délai-Gradient-acquisition) destinée à s'affranchir des effets de déplacement chimique.²² Un inconvénient de cette séquence est qu'après l'impulsion initiale de 90°, l'aimantation M est basculée dans le plan transversal (xy) où la relaxation en T_2 est mise en jeu. Pour limiter cet effet de relaxation transversale une séquence d'écho de spin stimulé a été utilisée préférentiellement (Figure 7-5). Dans cette séquence nous pouvons bénéficier d'une relaxation longitudinale (T_1) entre les deux gradients (au lieu de mesurer une relaxation trop rapide dans le plan transversal comme cela était proposé avec l'écho de spin simple).

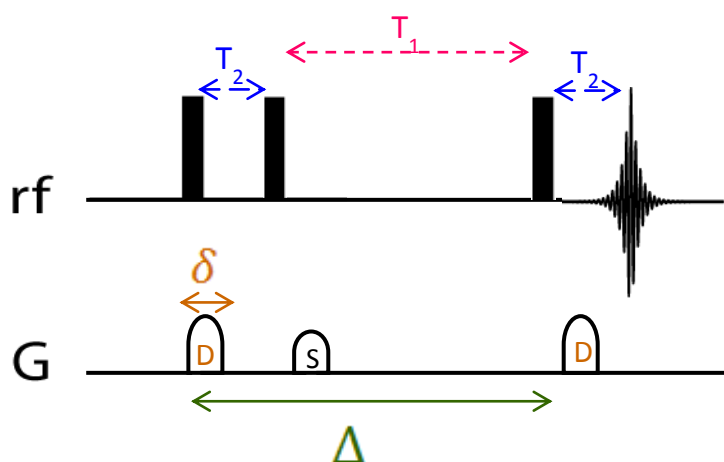


Figure 7-5 : Séquence de mesure de diffusion translationnelle par écho de spin stimulé (SSE). Les impulsions sont toutes de 90°. Les lettres D indiquent les gradients de diffusion, S le gradient de purge ('spoil') permettant de ne garder que l'aimantation sur l'axe z à ce moment de la séquence.

Nos expériences de diffusion sur un échantillon de sonde NTA mis en présence et en absence de zinc nous ont permis d'obtenir les résultats qui figurent sur le graphique de la figure 7-6.

Les valeurs de coefficient de diffusion D obtenues sur un échantillon contenant une concentration en biosonde de 260 μM à $T=298\text{K}$, sont de $3,87 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \pm 1,05 \cdot 10^{-11}$ lorsque la sonde en solution est libre, et de $2,09 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \pm 1,09 \cdot 10^{-11}$ à la saturation (à 50% en zinc). Un facteur 2 quasiment entre ces deux valeurs confirme ce phénomène de dimérisation (2 sondes venant complexer 1 ion Zn^{2+}).

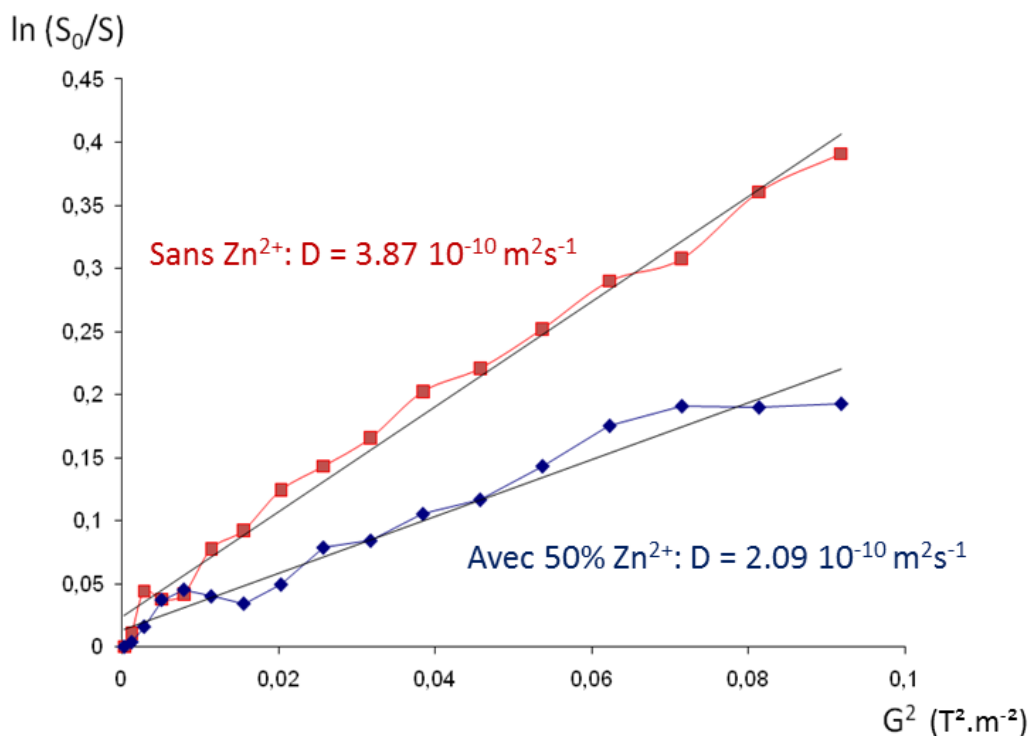


Figure 7-6 : Expérience de diffusion ^1H réalisée à 700 MHz à 298K avec une séquence d'écho de spin stimulée avec $\delta=1 \text{ ms}$ et $\Delta=150 \text{ ms}$. La courbe rouge est obtenue pour la sonde **1** en absence de zinc et la bleue en présence de 50% de zinc.

7.3.2.3. Imagerie

La différence de déplacement chimique de 1.7 ppm entre les signaux de xénon encapsulé dans la sonde énantio pure **1M** en présence et en absence de zinc ainsi que la finesse des pics obtenus sont suffisantes pour envisager le passage à l'IRM. Nous avons

réalisé en micro-imagerie à 11.7 T des images sélectives en fréquence basées sur une séquence d'écho de gradient FLASH (cf. Chapitre 4).

Les échantillons sur lesquels les images ont été effectuées contiennent 200 μM de sonde **1** et 100 μM d'ions Ca^{2+} (Figure 7-7). La solution utilisée pour l'image de gauche ne contient pas d'ions Zn^{2+} . Dans la solution utilisée pour l'image de droite, 100 μM d'ions Zn^{2+} ont été ajoutés. Ces images ont été réalisées avec une excitation sélective centrée sur le déplacement chimique de 67,20 ppm. La comparaison entre ces images met en évidence notre capacité à détecter et localiser de façon spécifique les ions Zn^{2+} .



Figure 7-7 : Images axiales ^{129}Xe d'écho de gradient rapide d'un tube de 8 mm contenant 200 μM de la sonde **1** et 100 μM d'ions Ca^{2+} . A gauche, la solution utilisée pour réaliser l'image ne contient pas d'ions Zn^{2+} . A droite, des ions Zn^{2+} ont été ajoutés avec une concentration de 100 μM . Les images ont été acquises avec une impulsion sélective centrée sur le déplacement chimique de 67,20 ppm, en 16 scans et avec un TR de 25 ms. L'acquisition de chaque image a pris 13 secondes (32 points et 781 μm par pixel dans chaque dimension).

Une fois la spécificité de notre approche établie, nous avons déterminé le seuil de sensibilité pour la détection du zinc. En utilisant des séquences de détection directe, et en introduisant 1 atm de xénon hyperpolarisé dans le tube RMN contenant la solution de sonde énantiopure en présence d'ions métalliques, nous sommes parvenus à détecter 97 nM de Zn^{2+} (Figure 7-8).

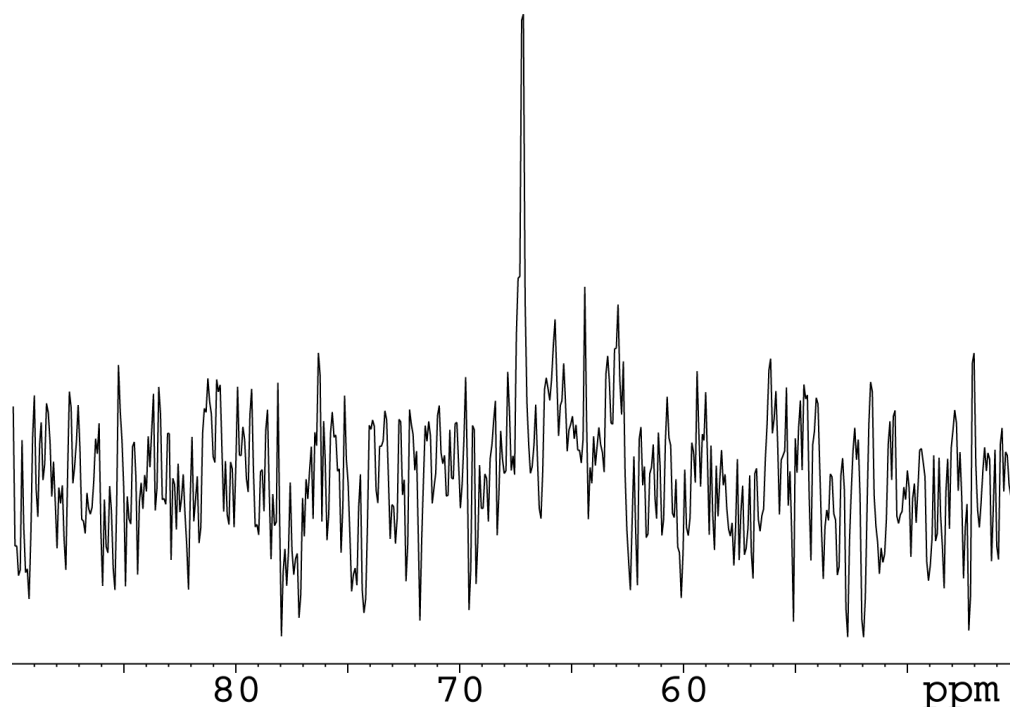


Figure 7-8 : Spectre RMN ^{129}Xe à 293 K et 11,7 T du xénon encapsulé dans la sonde concentrée à 194 nM et en présence de 50% d'ions Zn^{2+} . Pour la réalisation de ce spectre, une séquence impliquant une impulsion gaussienne de 500 μs centrée sur la fréquence Xe@sonde a été utilisée. Le nombre de scans a été fixé à 3584 et le délai entre chaque scan à 47 ms. Le temps total de cette expérience a été de 2 min 50 s.

Le seuil de détection des ions Zn^{2+} est ainsi 300 fois plus faible que celui atteint récemment en IRM proton par les agents de contraste de gadolinium.²³ A notre connaissance ce seuil est le plus faible jamais atteint par RMN, mais la fiabilité de notre approche devra être vérifiée *in vivo*.

7.3.2.4. Calcul de la constante d'affinité entre la biosonde et la tête NTA par RMN

Dans le cadre de la réalisation d'une sonde des ions Zn^{2+} , il est important que le complexe entre les ions métalliques et la sonde soit réversible, et donc que la constante d'affinité soit inférieure à celle rencontrée dans les métalloprotéines (où $\log K$ est de l'ordre

de 13). L'estimation la plus précise de cette constante est faite par calorimétrie isotherme à titration (ITC).

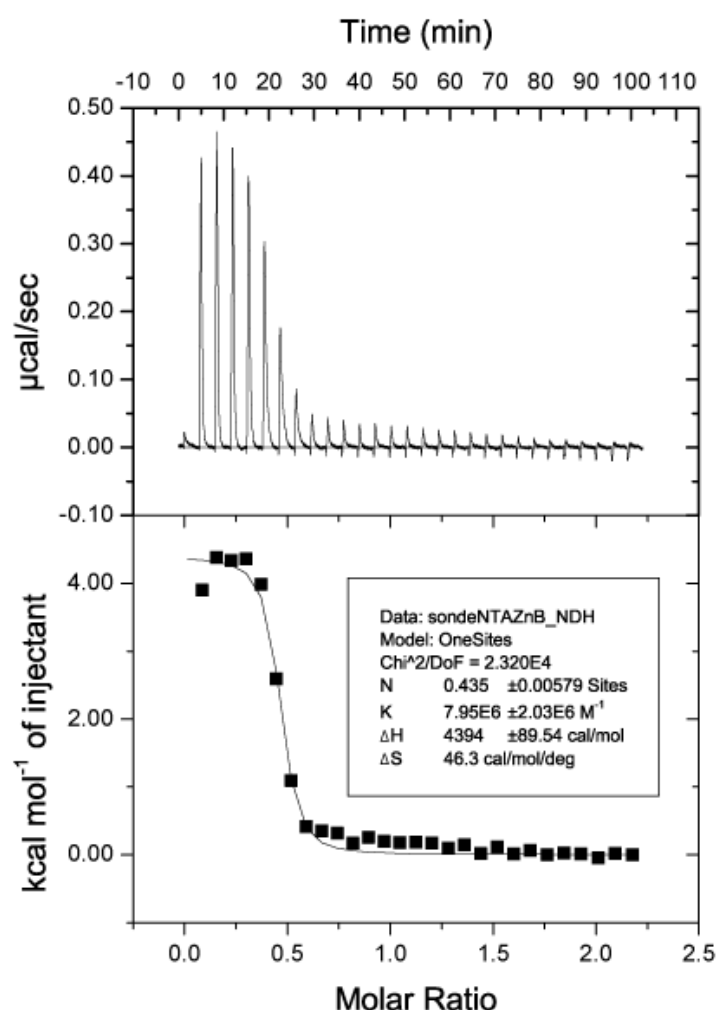


Figure 7-9 : Courbe ITC de l'interaction **1** – Zn^{2+} (obtenue par Thierry Brotin) à 293 K. La concentration en sonde est de 0.0313 mM et celle en Zn^{2+} de 0.313 mM.

La figure 7-9 montre les résultats obtenus par Thierry Brotin à l'ENS Lyon. On peut noter tout d'abord (valeur N en médaillon) que l'analyse des données ITC indique un rapport proche de 2 : 1 (2 cryptophanes pour 1 zinc), tout à fait en accord avec nos données de diffusion RMN. Ensuite, la constante d'affinité extraite est de $8 \pm 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2}$, ce qui est une valeur qui nous laisse présager un complexe réversible en présence de metalloprotéines, but que nous recherchions. Enfin, les valeurs de ΔH et ΔS obtenues montrent une interaction favorisée entropiquement.

A partir des spectres RMN ^{129}Xe obtenus pour différents ajouts de Zn^{2+} (Figure 7-2), nous avons essayé de voir si nous retrouvions le même ordre de grandeur pour la constante d'affinité avec les ions métalliques. Le développement suivant a donc été réalisé.

Dans le cas d'un complexe 2:1 tel que le complexe formé par la tête NTA et le zinc, l'équilibre tel que: $\text{Zn} + 2 \text{NTA} \rightleftharpoons \text{Zn}(\text{NTA})_2$, donne la constante K suivante :

$$K = \frac{[\text{Zn}(\text{NTA})_2]}{[\text{Zn}][\text{NTA}]^2}$$

Dans cette partie on cherche à mesurer cette constante par RMN, à l'aide des spectres effectués pour des concentrations croissantes en zinc en solution allant de 1 à 75 %. Décomposons dans un premier temps les termes impliqués en fonction des conditions initiales.

$$[\text{Zn}] = [\text{Zn}]_t - [\text{Zn}(\text{NTA})_2]$$

- $[\text{Zn}]$: Concentration en zinc au cours du temps
- $[\text{Zn}]_t$: Concentration totale de zinc (initialement introduite en solution)
- $[\text{NTA}]$: Concentration en biosonde au cours du temps
- $[\text{Zn}(\text{NTA})_2]$: Concentration en complexe zinc-biosonde formé (par les composés **1M** et **1P**) au cours du temps

Pour déterminer la concentration du complexe $[\text{Zn}(\text{NTA})_2]$ formé au cours du temps nous avons mesuré l'intégrale des pics caractéristiques du xénon encapsulé dans la sonde complexant (ou non) le zinc (cf. Figure 7-10).

- A : intégrale du pic de xénon encapsulé dans le composé **1M** complexant le zinc.
- b : intégrale du pic de xénon encapsulé dans le composé **1P** complexant le zinc (équivalent à A).
- B : intégrale des pics de xénon encapsulé dans le composé **1P** complexant le zinc et libre.

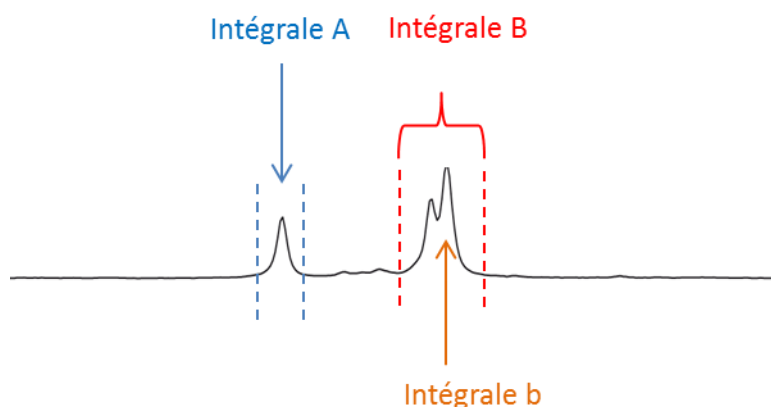


Figure 7-10 : Spectre RMN ^{129}Xe de la sonde mise en présence de zinc

Pour cette étude très demandeuse en biosonde, nous avons utilisé la biosonde issue du mélange racémique qui a été produite en plus grande quantité que la sonde énantiopure **1M**. Dans le mélange racémique, les deux pics à champ fort (celui du xénon dans le composé **1P** complexant le zinc à gauche de l'« intégrale b » sur la figure 7-10 et celui du xénon dans la sonde libre, « intégrale b ») sont très proches et difficilement intégrables. Aussi il n'est pas possible d'obtenir directement l'intégrale de la biosonde libre en solution.

Les intégrales des pics relatifs au composé **1M** et au composé **1P** lorsqu'ils complexent le zinc étant équivalentes et l'affinité pour le zinc étant considérée identique pour les 2 diastéréomères, l'intégrale du pic de la sonde libre pourra être obtenue en faisant le rapport entre les intégrales B et A. Maintenant, il faut se rappeler que les espèces ne sont pas observées directement, alors que le xénon encapsulé dans la sonde l'est. En solution, nous avons des dimères et des monomères, et on peut considérer que toutes les cages sont remplies par un atome de xénon. Lorsqu'on utilise l'intégrale xénon, il faut se rappeler que le signal à champ faible correspond à un dimère, et donc pour remonter à la concentration de dimère de l'espèce **1M**, il faut diviser cette valeur d'intégrale par 2.

$$\frac{A}{2} = \frac{1}{2} [\text{Zn(NTA)}_2]$$

A gauche de l'équation on divise par 2 pour tenir compte de cet effet, à droite le facteur ½ provient de la présence des diastéréomères.

$$B = [\text{NTA}] + [\text{Zn}(\text{NTA})_2]$$

$$A + B = [\text{NTA}] + 2[\text{Zn}(\text{NTA})_2] = [\text{NTA}]_t$$

D'où l'expression de la constante K suivante :

$$K = \frac{A}{([\text{Zn}]_t - A)(B - A)^2}$$

Les valeurs obtenues pour le calcul de la constante K pour chaque pourcentage de zinc en solution (de 1 à 75%) figurent dans la Table suivante :

$[\text{NTA}]_t$ (μM)	$[\text{Zn}]_t$ (μM)	A/B	A	B	K (M^{-2})
423,60	4,20	0,0024	1,01	422,62	$1,77 \cdot 10^6$
414,40	20,80	0,0945	35,78	378,62	$-2,03 \cdot 10^7$
403,30	40,50	0,1529	53,5	349,83	$-4,69 \cdot 10^7$
373,60	93,00	0,3769	102,25	271,30	$-3,87 \cdot 10^8$
372,60	187,00	0,8052	166,21	206,43	$4,94 \cdot 10^9$
371,70	287,00	0,8637	172,27	199,46	$2,03 \cdot 10^9$

Table 7-2 : Tableau de données comportant : les concentrations totales, en biosonde notée $[\text{NTA}]_t$ et en zinc noté $[\text{Zn}]_t$, les valeurs d'intégrale des pics de la figure 7-10, les valeurs de la constante K extraite pour chaque concentration de zinc.

On constate table 7-2 que l'extraction de la constante d'affinité par la mesure RMN ^{129}Xe n'est pas aisée car les résultats sont aberrants. Pour l'instant nous n'avons pas pu expliquer ces grandes variations ; la mesure par ITC reste beaucoup plus fiable.

7.4. Autres cations

Après l'étude du zinc nous nous sommes intéressés à l'influence des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} sur la sonde NTA. Ces ions ont été choisis car ils représentent également des réservoirs mobiles d'ions métalliques essentiels pour le corps humain et sont potentiellement en compétition avec le zinc.

Sur le spectre RMN du xénon hyperpolarisé, lors de l'ajout de calcium et de magnésium en présence de la sonde (seule ou accompagnée de zinc), aucun effet notable, c'est-à-dire aucune variation du déplacement chimique du xénon encapsulé, n'a été constaté (déjà observable en Figure 7-7). Au vue de la faible affinité de ces ions pour la tête NTA ($\log K = 6,4$ et $5,4$ pour Ca^{2+} et Mg^{2+} respectivement, cf. Table 7-1), ces résultats étaient prévisibles et conformes à nos attentes.

Si certains ions tels que le zinc, le calcium ou le magnésium sont biologiquement importants pour le bon fonctionnement de l'organisme, d'autres au contraire sont toxiques. C'est le cas notamment du cadmium, du cobalt, du mercure et du plomb.

Le cas du cadmium a été étudié, non seulement en raison de sa grande toxicité, mais aussi parce qu'il s'agit (comme le zinc) d'un métal de transition qui possède une bonne affinité pour la tête NTA ($\log K=9,5$). Au laboratoire nous avons réalisé nos expériences de détection du cadmium en préparant des échantillons à partir de la sonde énantiopure **1M** et d'un sel de chlorure de cadmium CdCl_2 . A 293 K et à pH 7.4, le spectre RMN ^{129}Xe montre un pic de complexation des ions Cd^{2+} par la sonde à 65,75 ppm, très proche du signal du xénon encapsulé dans la sonde chélatant le zinc.

L'autre métal, connu pour sa toxicité, auquel nous nous sommes intéressés est le plomb. Son affinité pour la tête NTA est également très élevée ($\log K= 11,8$). Pour nos expériences nous avons utilisé un sel de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Les conditions expérimentales ont dû être adaptées au plomb en choisissant un tampon HEPES, doté d'un pH 7.6, qui est connu pour ne pas interagir sensiblement avec le plomb (contrairement à beaucoup d'autres tampons). Etudié en présence de la sonde **1M**, à 293 K, l'ajout de plomb fait apparaître un pic à 70.0

ppm sur le spectre xénon 129. Ce signal est attribué au déplacement chimique du xénon encapsulé dans la sonde complexant les ions Pb^{2+} . Ce résultat, fort intéressant, est plutôt étonnant étant donné que nous ne nous attendions pas à une aussi grande variation de déplacement chimique pour le plomb puisqu'il ne fait pas partie des métaux de transition.

Une fois que les résultats propres à chaque ion ont été obtenus successivement, nous nous sommes interrogés sur la possibilité de détecter ces cations simultanément.

7.4.1. Vers un 'ionomètre'

7.4.1.1. Préparation des échantillons

Le choix du tampon pour la détection simultanée de ces ions s'est porté sur l'HEPES puisqu'il n'interagit avec aucun des 3 ions. La solution d'HEPES commercialisée par Sigma-Aldrich a été préalablement lyophilisée pour être reprise dans D_2O .

La concentration de sonde **1M** mise en jeu est de l'ordre du milimolaire (975 μM) (soit 1.72 mg de sonde repris dans 600 μL de D_2O). Chaque ion a été introduit successivement dans un même tube RMN dans un rapport de 5% par rapport à la sonde. Ce rapport a été choisi afin d'avoir de la sonde sous forme libre en solution.

Le premier ion à être introduit en solution a été Zn^{2+} . Puis nous avons ajouté 5% d'ion Cd^{2+} et enfin 5% de Pb^{2+} . Un spectre RMN ^{129}Xe a été réalisé après l'ajout de chaque cation (Figure 7-11).

7.4.1.2. Résultats RMN et discussion

Les spectres de xénon ^{129}Xe hyperpolarisé obtenus sont présentés dans la figure suivante.

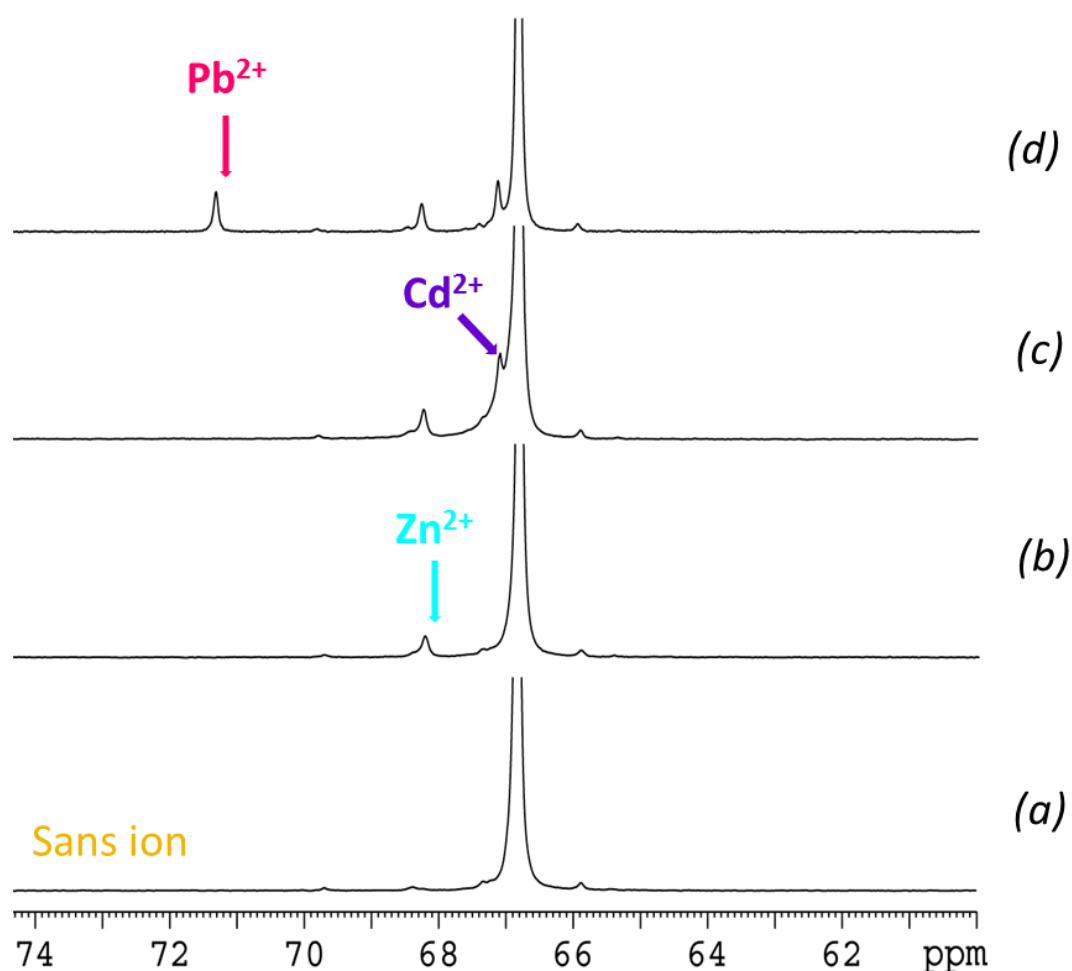


Figure 7-11 : Spectre RMN du ^{129}Xe obtenu en 1 scan à 293 K et 11.7 T pour un échantillon contenant $\sim 1\text{mM}$ de sonde **1M** en a), puis en présence de 5 % d'ions Zn^{2+} en b), plus 5% d'ions Cd^{2+} en c) et de 5% de Pb^{2+} en d). Le petit pic à 65.9 ppm doit correspondre au xénon encapsulé dans le cryptophane hexa-carboxylate résiduel.

Remarquablement, un nouveau pic, de fréquence à chaque fois spécifique et bien défini, apparaît avec l'ajout d'un nouvel ion.

Les intégrales des signaux du xénon dans la sonde chélatant différents ions ont des valeurs proches, ce qui montre que l'on peut utiliser cette sonde pour des déterminations

quantitatives d'ions présents en solution. La constante d'affinité du xénon pour la cage n'est pas sensiblement modifiée par la chélation d'un ion ou d'un autre.

De plus, nous avons constaté que si l'écart de déplacement chimique, entre le signal de xénon dissous et le signal de xénon encapsulé dans la sonde est variable en fonction de la température, du pH et du solvant, par contre l'écart entre la fréquence du xénon dans la sonde libre et celle du xénon dans la sonde chélatant chaque ion est constant. On peut ainsi imaginer l'IRM des différents ions 'calée' en fréquence par rapport à la fréquence du xénon dans la sonde libre.

Nous obtenons donc les résultats suivants en déplacement chimique propre à chaque ion :

$\Delta\delta$	Valeur en ppm
$\Delta\delta$ (zinc-biosonde libre)	1,7
$\Delta\delta$ (cadmium-biosonde libre)	0,25
$\Delta\delta$ (plomb-biosonde libre)	4,5

Table 7-3 : Tableau présentant les écarts de déplacements chimiques du xénon encapsulé propres à la détection de chaque ion en solution, avec $\Delta\delta$ représentant l'écart entre le déplacement chimique du xénon dans la sonde complexant le dication et le déplacement chimique du xénon dans la sonde libre.

Pour aller encore plus loin dans l'étude de cette sonde avec différents cations, nous avons testé l'effet du mercure au sein du mélange d'ions. Cet ion métallique toxique a été choisi car il fait partie des métaux de transition.

Une solution à 480 μM de sonde **1M** dans le même tampon HEPES a été préparée en gardant des proportions de 5 % pour les ions Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} et Hg^{2+} par rapport à la concentration de la sonde.

Les résultats du mélange de ces 4 ions figurent dans le spectre suivant :

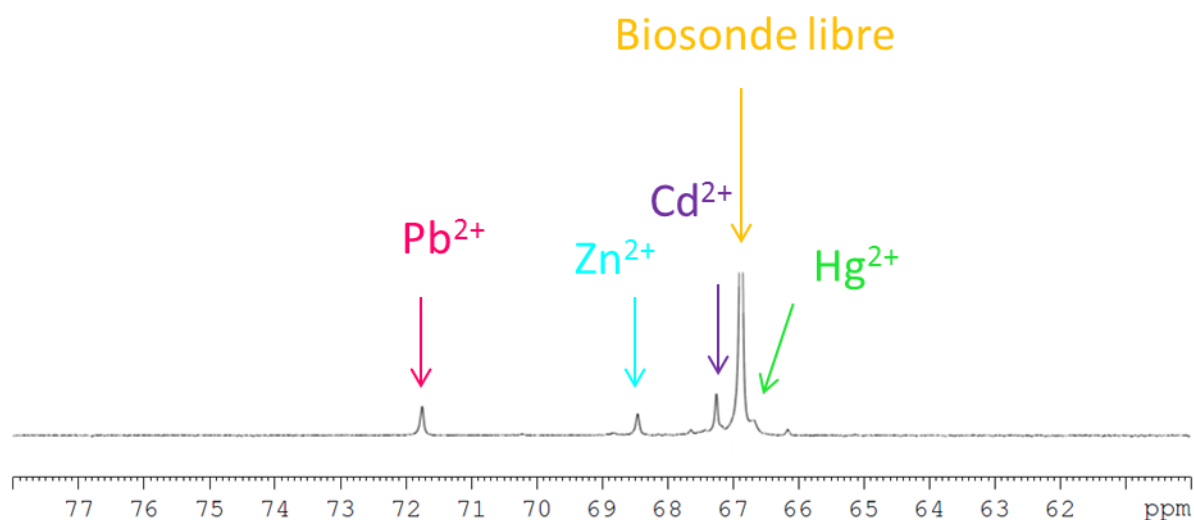


Figure 7-12 : Spectre RMN du ^{129}Xe obtenu en 1 scan à 293 K et 11.7 T pour un échantillon contenant 0.48 mM de biosonde et 5 % de d'ions Zn^{2+} , 5% d'ions Cd^{2+} , 5% de Pb^{2+} et 5% de Hg^{2+} .

L'ajout de mercure a pour conséquence l'apparition d'un nouveau pic de xénon encapsulé très proche de celui du xénon encapsulé dans la biosonde libre, tel que : $\Delta\delta$ (mercure-biosonde libre) = - 0,1 ppm d'après le spectre de la figure 7-12. Cet écart de déplacement chimique trop faible fait que cette sonde n'est pas adaptée pour la détection des ions mercure.

Une explication de ce résultat peut être trouvée dans une potentielle faible affinité (non trouvée dans la littérature) des ions mercure pour la tête NTA. Notons de plus que le zinc et le cadmium (surtout le zinc) sont connus pour leur arrangement tétraédrique dans les métalloprotéines²⁴ alors que le mercure au contraire se lie principalement de façon linéaire.

En conclusion de cette série d'expériences, les déplacements chimiques obtenus nous font envisager une corrélation forte avec l'affinité des ions pour la tête NTA ; plus l'affinité de l'ion pour la sonde est grande, plus l'écart de déplacement chimique avec le signal de xénon dans la sonde seule sur le spectre RMN de xénon hyperpolarisé sera grand.

7.4.2. Ions uranyle

Un autre type d'ions également très toxique, a été étudié. Il s'agit de l'ion uranyle de formule UO_2^{2+} , connu pour interagir avec la tête NTA.²⁵ Le composé solide d'uranyle que nous avons manipulé est le sel $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ de couleur jaune fluo.

Cette expérience a été menée en collaboration avec Jean-Claude Berthet, chimiste du SIS2M. Notre échantillon à base d'uranyle a été préparé sous boîte à gants d'argon pour éviter tout contact avec l'oxygène et en tampon HEPES (0,27 mg de sonde dans 600 μL d'eau tamponnée à l'HEPES avec 25 % d'ions UO_2^{2+}).

Nous n'avons pas pu observer de nouvelle valeur distincte de déplacement chimique du xénon encapsulé. Nous avons seulement observé un élargissement spectral aux environs de la fréquence du xénon encapsulé dans la biosonde libre, qui correspondrait au déplacement chimique du xénon encapsulé dans la sonde interagissant avec l'ion UO_2^{2+} (Figure 7-13).

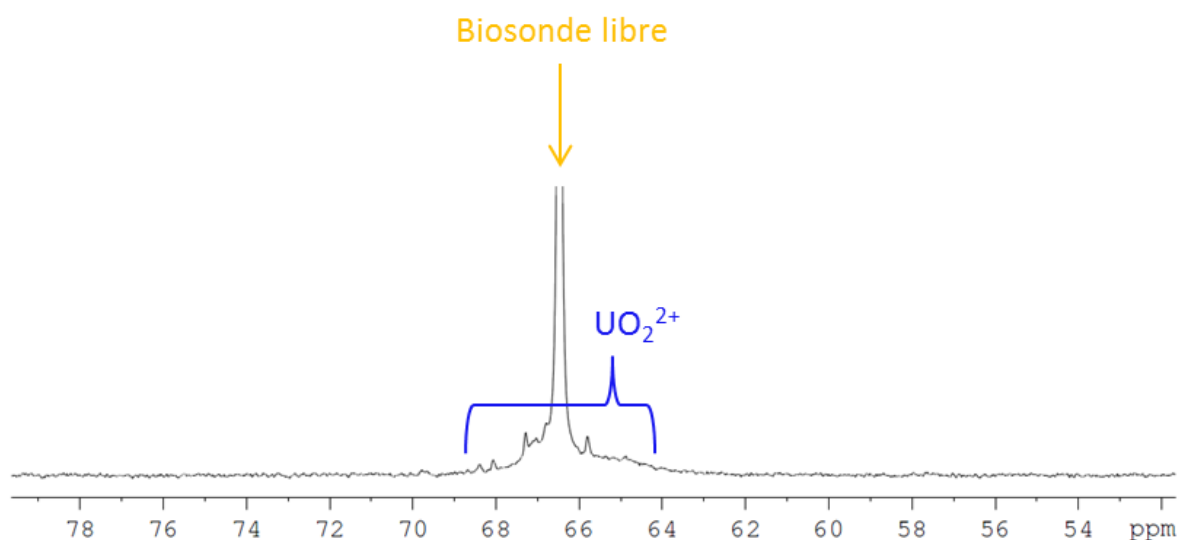


Figure 7-13 : Spectre RMN du ^{129}Xe obtenu en 1 scan à 293 K et 11.7 T pour un échantillon contenant 1.14 mM de biosonde et 25 % d'ions UO_2^{2+} .

Ce résultat étant difficilement exploitable, cette sonde ne semble donc pas adaptée pour la détection aisée des ions UO_2^{2+} .

7.4.3. Imagerie simultanée et sensible des différents ions

Les écarts de déplacement chimique atteints étant importants pour les cas du zinc et du plomb, nous avons souhaité imager simultanément ces 2 ions par IRM du xénon ^{129}Xe hyperpolarisé. En utilisant une séquence d'écho de gradient FLASH entrelacée décrite en figure 5-17 sur le mélange précédent à 5 % d'ions (Pb^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+}), nous avons pu réaliser les images du xénon encapsulé dans la sonde lorsque celle-ci chélate des ions Pb^{2+} et des ions Zn^{2+} (images encadrées en rouge et en bleu respectivement) (Figure 7-14). L'écart de déplacement chimique étant trop faible entre les ions Cd^{2+} et la biosonde seule, l'image du xénon piégé dans la sonde complexant les ions Cd^{2+} n'a pas été réalisée (l'image de droite contient majoritairement la contribution du xénon dans la sonde libre).

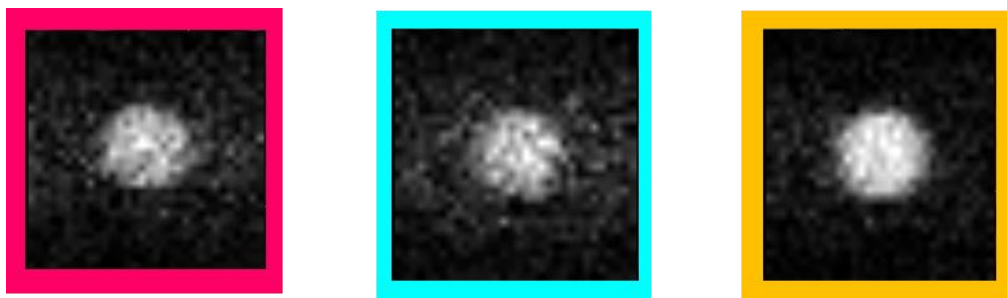


Figure 7-14 : Images IRM ^{129}Xe axiales en écho de gradient à 293 K et à 11,7 T sur un échantillon de sonde **1M** en solution aqueuse tamponnée à l'HEPES. La concentration en biosonde est de 975 μM , celle des ions Pb^{2+} et Zn^{2+} est de 5 %. Ces images sont obtenues simultanément au moyen de la séquence de la Figure 5-17. Cadre rouge : excitation centrée sur la fréquence Xe@1M-Pb^{2+} ; cadre cyan : excitation centrée sur la fréquence Xe@1M-Zn^{2+} ; cadre orange : excitation centrée sur la fréquence Xe@1M-Cd^{2+} . Les images ont été réalisées en 8 scans et avec un TR de 54.7 ms. L'acquisition de ces 3 images a pris 14 secondes (32 points et 781 μm par pixel dans chaque dimension).

Pour gagner encore en sensibilité, nous avons entrepris de travailler sur des schémas d'impulsions plus sophistiqués pour la détection du xénon. Avec l'HyperCEST, nous pensons gagner encore en sensibilité (cf. Chapitre 5). Cependant pour ce type de séquence, la problématique est différente et plus délicate que pour la détection directe. En effet, nous disposons d'une sonde activable dont la fréquence du xénon encapsulé varie en fonction de

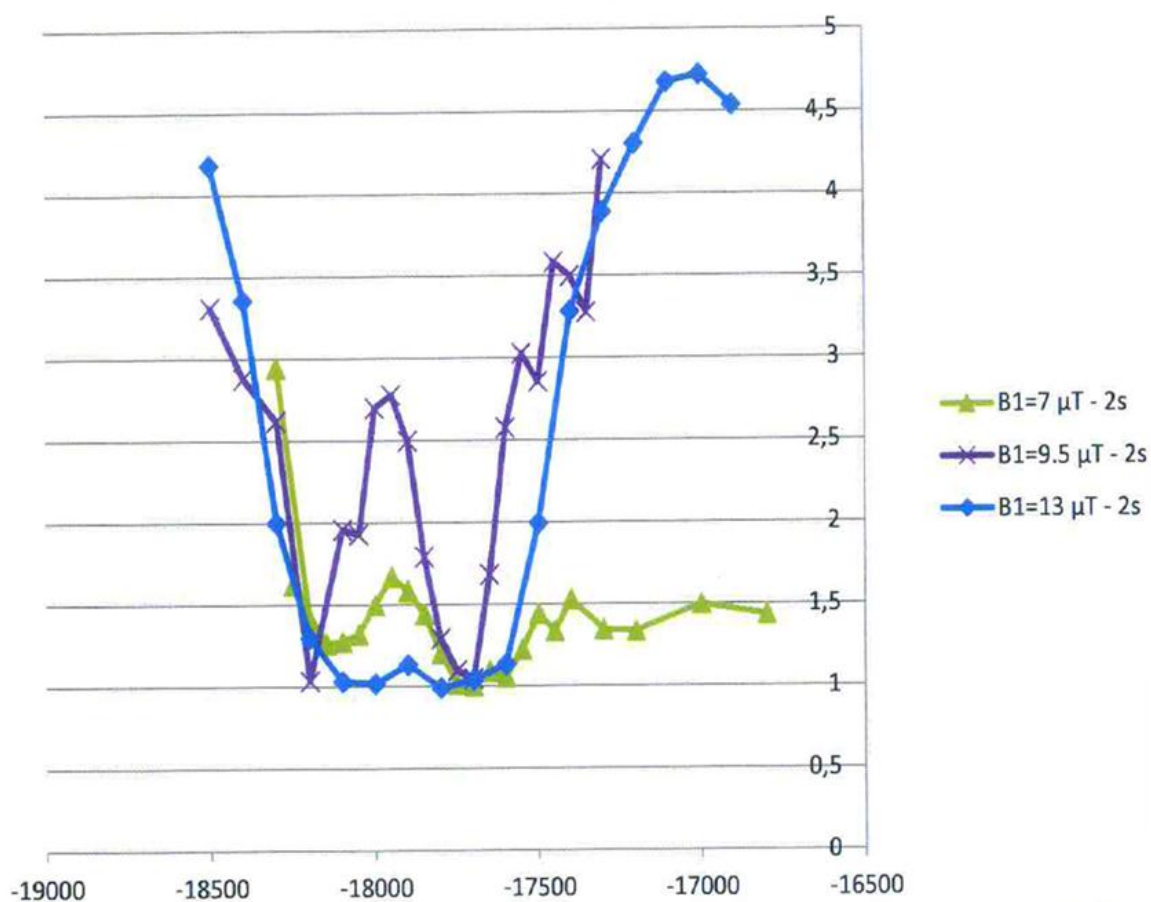
la cible ou de l'évènement détecté. Aussi avec l'hyperCEST, la difficulté n'est plus seulement d'atteindre un seuil de détection très bas, mais elle est aussi de permettre la détection simultanée des 2 signaux (par exemple différencier le xénon dans la sonde libre du xénon dans la sonde chélatant le plomb). L'enjeu de ce type de séquence est donc la spécificité. Le challenge est de pouvoir distinguer 2 fréquences proches alors qu'une saturation est nécessairement utilisée.

Nous décrivons ici les premières étapes (et qui sont encore en cours) de l'adaptation de cette séquence d'HyperCEST au cas de notre sonde, dans le but de trouver les meilleures conditions expérimentales pour cette approche.

La première étape a consisté à déterminer le champ radiofréquence de saturation à utiliser. Sur un échantillon de 240 μM de biosonde **1M** et en présence de zinc et de plomb, nous avons appliqué 3 différents champs B_1 de 7, 9.5 et 13 μT (saturation continue pendant 2 s). Avec cette séquence et de tels champs radiofréquence, les spectres z de la figure 7-15 ont pu être obtenus.

Les premiers résultats sont très encourageants. D'une part, nous avons pu obtenir avec ces 3 champs de saturation un spectre z distinguant nettement et systématiquement la fréquence du xénon encapsulé dans la sonde libre de celle liée au plomb. D'autre part, nous pouvons conclure qu'une valeur de champ de saturation B_1 de 7 μT appliquée pendant 2 secondes est suffisante pour notre étude. Il semble cependant que l'on n'ait pas assez de résolution spectrale (pour la saturation) permettant de distinguer le signal du xénon dans la sonde libre du signal du xénon dans la sonde chélatant les ions Zn^{2+} .

Spectre Z



$\Delta\nu$

= écart par rapport à la fréquence du signal de xénon dissous (en Hz)

Figure 7-15 : Spectres z obtenus à partir d’une séquence d’HyperCEST développée au laboratoire sur un échantillon de sonde concentré à 194 nM en présence de 50% de zinc. Les spectres ont été réalisés pour 3 valeurs B_1 de 7, 9.5 et 13 μT (onde continue pendant 2s).

La seconde étape du développement de cette séquence, consistera dans le futur, à tenter de passer d’une saturation continue à une saturation plus sélective en fréquence comme décrit dans les récents travaux de l’équipe de Pines.²⁶

Par ailleurs, toujours dans le but d’augmenter la sensibilité de détection des ions Zn^{2+} , Pb^{2+} ,... par cette approche, après avoir songé à des schémas d’impulsions plus adaptés nous avons voulu modifier la sonde elle-même. Un dérivé de cette sonde comportant entre 4 et 6 substituants NTA a été testé. Cette sonde méritait d’être envisagée dans la mesure où

si 1 tête NTA complexait les ions et apportait une très bonne sensibilité, en multipliant le nombre de têtes NTA, nous pouvions nous attendre à gagner encore plus en sensibilité. Ceci n'a pas été le cas. Dans la zone où nous obtenions précédemment un pic fin et distinct de xénon dans la biosonde, nous avons obtenu avec cette biosonde un pic large non utilisable pour distinguer la présence d'ions Zn^{2+} . La densité électronique au voisinage du xénon encapsulé semble donc ne pas être la seule cause de sa variation de déplacement chimique.

7.5. Conclusions et perspectives

Nous avons rendu possible pour la première fois la détection des ions Zn^{2+} à une concentration aussi faible que 100 nM par IRM et RMN grâce à une sonde xénon 129 dont le ligand permet de chélater les dications métalliques. Nous avons de plus démontré la possibilité, l'importance et la puissance de travailler avec la forme énantiopure des biosondes ^{129}Xe à base de cryptophanes. Par ailleurs, étant donné les affinités mises en jeu, la chélation des ions par cette sonde peut être réversible et offre donc l'avantage de ne pas déréguler le système dans lequel elle intervient en relâchant en solution les ions complexés. Cet avantage est considérable si on envisage les applications *in vivo*. Le potentiel de cette sonde de xénon 129 étendu à la détection simultanée d'autres ions toxiques tels que le cadmium, le plomb le cobalt a pu être démontré. D'autres dications non étudiés à ce jour pourraient également être détectés par cette approche et cette sonde.

D'autres essais pourraient être mis en œuvre pour exploiter davantage le potentiel de cette approche, comme changer le type de ligand pour tenter de complexer d'autres types d'ions, dont notamment ceux qui n'ont pu être complexés par la tête NTA.

REFERENCES

- (1) Frederickson, C. J.; Koh, J. Y.; Bush, A. I. *Nature Reviews Neuroscience* **2005**, *6*, 449.
- (2) Auld, D. S. *BioMetals* **2001**, *14*, 271.
- (3) Bush, A. I. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 184.
- (4) Barnham, K. J.; Bush, A. I. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 222.
- (5) Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207.
- (6) Smith, J. L.; Xiong, S.; Markesbery, W. R.; Lovell, M. A. *Neuroscience* **2006**, *140*, 879.
- (7) Rice, B. W.; Cable, M. D.; Nelson, M. B. *Journal of Biomedical Optics* **2001**, *6*, 432.
- (8) Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **2001**, 1840.
- (9) Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Narazaki, M.; Yokawa, T.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Nagano, T. *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 1027.
- (10) Major, J. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 13881.
- (11) Major, J. L.; Boiteau, R. M.; Meade, T. J. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47*, 10788.
- (12) Esqueda, A. C.; Lopez, J. A.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzon, J. C.; Ratnakar, J.; Lubag, A. J. M.; Sherry, A. D.; De Leon-Rodriguez, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11387.
- (13) Zhang, X. A.; Lovejoy, K. S.; Jasanoff, A.; Lippard, S. J. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **2007**, 234.
- (14) Trokowski, R.; Ren, J. M.; Kalman, F. K.; Sherry, A. D. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 6920.
- (15) Brotin, T.; Dutasta, J.-P. *Chem Rev* **2009**, *109*, 88.
- (16) Berthault, P.; Desvaux, H.; Wendlinger, T.; Gyejacquot, M.; Stopin, A.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Boulard, Y. *Chemistry, a European Journal* **2010**, *16*, 12941.
- (17) Kotera, N.; Tassali, N.; Delacour, L.; Traoré, T.; Buisson, D.; Boutin, C.; Berthault, P.; Brotin, T.; Dutasta, J.-P.; Taran, F.; Rousseau, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4100.
- (18) Huber, G.; Brotin, T.; Dubois, L.; Desvaux, H.; Dutasta, J.-P.; Berthault, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6239.
- (19) Anderegg, G. *Pure and Applied Chemistry* **1982**, *54*, 2693.
- (20) Chaberek, S.; Courtney, R. C.; Martell, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5057.
- (21) Bouchet, A.; Brotin, T.; Linares, M.; Cavagnat, D.; Buffeteau, T. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 7816.
- (22) Stejskal, O. E.; Tanner, J. E. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288.
- (23) Esqueda, A.; Lopez, J.; Andreu-de-Riquer, G.; Alvarado-Monzon, J.; Ratnakar, J.; Lubag, A.; Sherry, D.; De Leon-Rodriguez, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11387.
- (24) Rulisek, L.; Vondrasek, J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, *71*, 115.
- (25) Bonin, L.; Guillaumont, D.; Jeanson, A.; Den Auwer, C.; Grigoriev, M.; Berthet, J.; Hennig, C.; Scheinost, A.; Moisy, P. *Inorg. Chem.* **2009**, *9*, 3943.
- (26) Meldrum, T.; Bajaj, V.; Wemmer, D.; Pines, A. *J. Magn. Reson.* **2011**, *213*, 14.

Chapitre 8

Résultats *in vivo*

Chapitre 8 - Résultats *in vivo*

8.1. Les objectifs

L'objectif à terme de cette recherche est la détection, le suivi, la caractérisation ou encore la stadification de pathologies pulmonaires à l'aide de l'approche d'IRM moléculaire reposant sur l'utilisation de biosonde de ^{129}Xe hyperpolarisé. Cette partie constitue la mise en œuvre de tous les principes vus précédemment. A cela s'ajoute les problématiques de l'*in vivo* qu'il faut également considérer, à savoir le développement d'un protocole adapté au petit animal, l'instrumentation, et les limites propres à l'*in vivo* à prendre en compte. Nos recherches porteront sur deux axes principaux : les voies d'administration du xénon (injection dans des solutions biocompatibles ou inhalation), et les voies d'administration d'une biosonde dans les poumons pour la détection *in vivo* du xénon vectorisé.

Avant la présentation des résultats obtenus au laboratoire, nous nous intéresserons à l'état de l'art. Les références bibliographiques dans ce domaine sont plus que conséquentes. La liste que nous en donnons n'a pas vocation à être exhaustive. Nous tenterons dans cette partie de citer les travaux qui nous seront les plus utiles et les avancées les plus importantes portées à notre connaissance.

8.2. Etat de l'art

L'IRM du proton, connue pour sa limite d'application en ce qui concerne les pathologies pulmonaires en raison de la faible densité en noyau d'hydrogène et des nombreuses interfaces entre l'air et les tissus qui impliquent d'importantes différences de susceptibilité magnétique, ne délivre qu'un très faible signal quasi-inexploitable. Ce n'est que dans les années 90 avec l'utilisation des gaz hyperpolarisés qu'il a été possible de réaliser l'IRM des poumons. La première image d'application biomédicale du xénon ^{129}Xe hyperpolarisé a été réalisée dans le volume intra-pulmonaire des poumons de souris en

1994.¹ Les premières images réalisées sur l'homme sont publiées en 1996 par les équipes de Kauczor et al. et de MacFall et al.^{2,3}

8.2.1. IRM anatomique

Une première tendance historique avait été d'utiliser l'hélium 3 pour l'imagerie des voies aériennes. L'hélium 3 dispose d'un rapport gyromagnétique plus élevé (a priori meilleure résolution spatiale) et d'un niveau d'hyperpolarisation potentiellement plus important, et donc finalement d'une sensibilité plus importante que le xénon 129 (environ un ordre de grandeur de plus). La figure 8-1 par exemple, donne une image de poumons sains obtenue grâce à de l'hélium 3 hyperpolarisé.



Figure 8-1 : Image coronale obtenue par ventilation à l'hélium 3 hyperpolarisé d'un volontaire au poumon sain.⁴

Dès lors, l'imagerie par résonance magnétique de l'³He hyperpolarisé offre le potentiel d'être une technique de choix pour imager la structure anatomique des poumons. Les travaux de deux équipes : Salerno et al. et Fain et al. résument les avancées de l'IRM de l'³He hyperpolarisé en présentant un outil puissant, visuel et direct de diagnostic des maladies pulmonaires les plus développées, parmi lesquelles on comptera : l'asthme, la fibrose kystique (mucoviscidose), et la broncho-pneumopathie chronique obstructive,

abrégée BPCO ou dite COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) pour les anglophones. La méthode développée a fait ses preuves en montrant qu'à partir d'une simple inhalation d'hélium hyperpolarisé il est possible d'avoir une image des poumons caractéristique d'une maladie donnée.^{4,5}

L'asthme, qui est une maladie caractérisée par une inflammation chronique et une obstruction réversible des petites voies aériennes, a pour conséquence des défauts de ventilation pulmonaire. L'imagerie du gaz hyperpolarisé offre le grand avantage et la grande sensibilité de pouvoir détecter des anomalies même chez des patients asthmatiques a priori asymptomatiques et ayant un examen spirométrique normal. Une image coronale des poumons d'un patient asthmatique est donnée en figure 8-2. Les zones plus foncées représentent un défaut de ventilation.

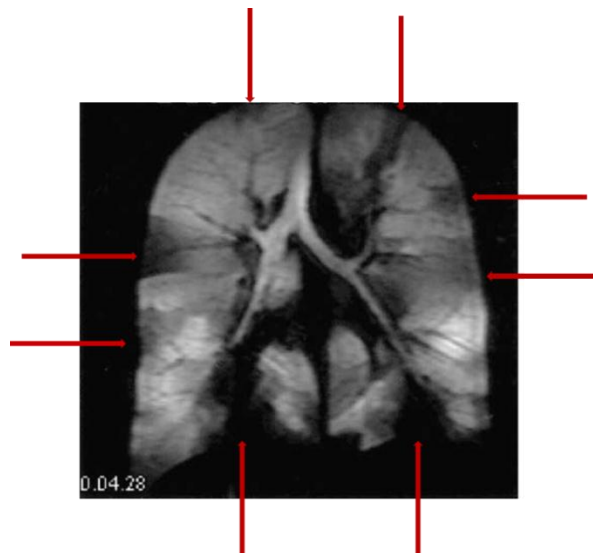


Figure 8-2 : Image coronale d'hélium 3 hyperpolarisé d'un cas de patient asthmatique. Les flèches rouges indiquent les zones de défaut de ventilation.⁴

Dans le cas de l'ischémie (qui est un cas de COPD, atteignant surtout les fumeurs) la maladie, irréversible, atteint les bronches. Il y a un élargissement anormal des voies aériennes menant jusqu'aux bronchioles pouvant entraîner la destruction des alvéoles. Les conséquences d'une telle pathologie sont d'une part une déformation de la morphologie de la microstructure des poumons, d'autre part un défaut de ventilation pulmonaire. La figure

8-3 présente une image coronale d'hélium 3 hyperpolarisé d'un fumeur de longue date. Le caractère spongieux relevé par cette imagerie est caractéristique de ce type de maladie.

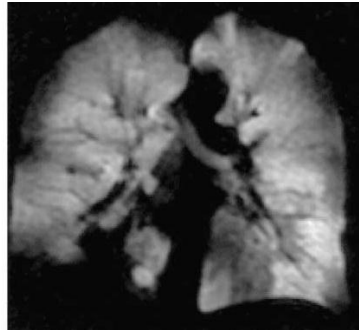


Figure 8-3 : Image coronale d'hélium-3 hyperpolarisé des poumons d'un patient fumeur souffrant d'une maladie respiratoire de type COPD.⁴

Le dernier cas que nous citerons dans cette partie concerne la fibrose kystique, appelée mucoviscidose, qui est une maladie pulmonaire génétique répandue. Elle se caractérise par la sécrétion d'un mucus anormalement épais en raison d'un manque de transport d'ions chlorure dans l'épithélium du poumon, provoquant des inflammations et des déficiences respiratoires ainsi que des bouchons dans les bronches. Dans ce cas de figure l'imagerie de l'hélium 3 hyperpolarisé permet de caractériser à un stade très avancé la maladie en donnant une image caractéristique de poumons qui semblent être troués (figure 8-4).

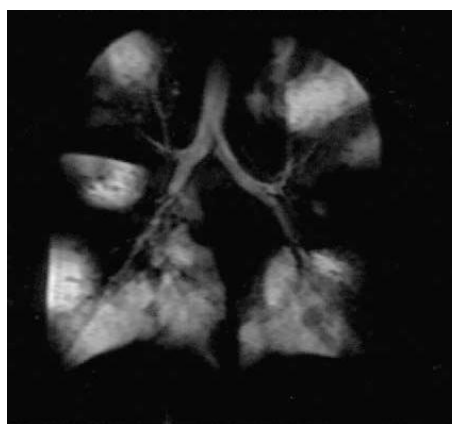


Figure 8-4 : Image coronale d'He³ hyperpolarisé des poumons d'un patient souffrant de mucoviscidose.⁴

Sans développer ce dernier cas d'application, nous soulignerons que l'IRM des gaz hyperpolarisés peut également être utilisée pour mesurer l'état d'une transplantation (son stade, son succès ou son échec).

Si l'hélium 3 possède des avantages sur le xénon 129 et notamment un signal de résonance magnétique le plus intense pour l'imagerie anatomique des poumons, il n'en est pas de même pour l'imagerie fonctionnelle. Dans ce domaine l'utilisation du xénon 129 semble bien plus adaptée. En effet l'hélium 3 ne possède pas une aussi grande gamme de déplacement chimique et se dissout très faiblement dans le sang et les tissus. Ensuite il faut ne pas oublier que l' ^3He est rare sur terre et que les stocks disponibles tendent à s'épuiser. Enfin, le xénon se polarise plus facilement et est déjà utilisé en tant qu'anesthésiant. Pour toutes ces raisons, le xénon 129 représente le noyau de choix pour l'étude fonctionnelle des poumons par IRM. Notons toutefois l'émergence de travaux récents des équipes de B. Driehuys et de W. Warren pour la détection de métastases pulmonaires par IRM de l'hélium 3 hyperpolarisé. Les cellules cancéreuses sont ciblées grâce à des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPIO) fonctionnalisées avec des ligands spécifiques, ce qui se traduit sur l'IRM de l'hélium 3 hyperpolarisé par un défaut de signal dans les régions tumorales.⁶

8.2.2. Etude de la fonction pulmonaire par IRM

La fonction du poumon est d'assurer l'échange de l'oxygène et du dioxyde de carbone avec le sang et les tissus. Cet échange gazeux repose sur la diffusion des gaz (des alvéoles au sang) à travers la fine barrière tissulaire séparant la cavité d'air des capillaires sanguins. Certaines des pathologies pulmonaires que nous avons citées plus haut causent un épaissement de cette barrière gaz-sang ce qui amoindrit l'efficacité de l'échange gazeux.

Pour l'étude de la fonction du poumon par RMN du xénon 129, une équipe de l'Université de Virginie a développé les bases de la séquence XTC (Xenon polarization Transfer Contrast) en 2000.⁷ Cette méthode (dont la technique HyperCEST dérive) a été utilisée car il était difficile de détecter directement le signal de xénon dissous dans les tissus étant donné : 1) sa faible concentration (~10 % du gaz introduit dans les poumons donne lieu

au signal de gaz^{8,9} et le signal de xénon dissous représente 1 à 2 % de ce signal⁷), et 2) le temps de relaxation transversale réduit d'un facteur 10 environ (le T_2^* du xénon passe de 20 ms à ~2 ms dans les tissus¹⁰). Pour contourner cette difficulté, l'idée est de détecter la diminution de l'aimantation du réservoir de gaz en large excès après une série d'impulsions saturant sélectivement l'aimantation du xénon dissous (autour de 208 ppm). Comme dans l'HyperCEST, il s'agit de profiter de l'échange xénon gaz – xénon dissous. La méthode XTC consiste donc à étudier le contraste induit au niveau de la phase xénon gaz. A partir de ces images XTC, des cartes de dépolarisation sont obtenues permettant de quantifier la densité du parenchyme des poumons. En 2011, une implémentation de cette technique, dénommée MXTC, est appliquée pour des temps d'échange multiples afin d'acquérir les images en 4 dimensions (3 spatiales et 1 pour le temps d'échange). Cette technique permet de faire ressortir 2 paramètres caractéristiques de la fonction du poumon : 1) MXTC-F qui est la valeur de la dépolarisation à temps d'échange long et qui est proportionnelle au rapport entre les volumes tissulaire et alvéolaire, donc significatif de la déformation des microstructures du poumon, et 2) MXTC-S qui est la racine carrée de la constante d'échange du xénon et qui caractérise l'épaisseur et la composition des septa alvéolaires.¹¹

La deuxième équipe à travailler sur le sujet est celle de B. Driehuys.^{10,12} La méthode XACT (Xenon Alveolar Capillary Imaging) a été développée par cette équipe dans le but de gagner en sensibilité par rapport à la méthode XTC et surtout pour développer une méthode basée sur la différence de fréquence de résonance du xénon dans la barrière tissulaire et du xénon dans les globules rouges permettant de faire 2 images distinctes de ces environnements. En utilisant ce procédé, des images du xénon: 1) dans la cavité pulmonaire, 2) dans la barrière pulmonaire (le tissu pulmonaire) et 3) dans les globules rouges ont pu être obtenues distinctement. Ainsi, un gain de sensibilité et de spécificité ont pu être obtenus. La possibilité de détecter directement l'image du xénon dissous dans des poumons humains a également été démontrée.¹³

8.2.3. Mode d'administration du xénon

Le montage le plus récent mis en œuvre pour délivrer le xénon par infusion au sein de la cavité des poumons et du système sanguin pulmonaire a été développé en février dernier par l'équipe de Driehuys.¹⁴ Leur dispositif consiste à délivrer un flux continu de xénon hyperpolarisé. 300 ml de xénon hyperpolarisé à ~10% (grâce à un prototype commercial de pompage optique) sont introduits dans un sac Tedlar placé au milieu d'un cylindre de plexiglas) qui est infusé dans le sang en utilisant des membranes originellement conçues pour l'oxygénation extracorporelle du sang.¹⁵ Avec un tel système le xénon gazeux diffuse des pores vers le sang artériel de façon continue. Ensuite, le xénon sanguin passe par les poumons, pour enfin être évacué par la bouche. La respiration et le système sanguin sont contrôlés par une pompe péristaltique (Figure 8-5).

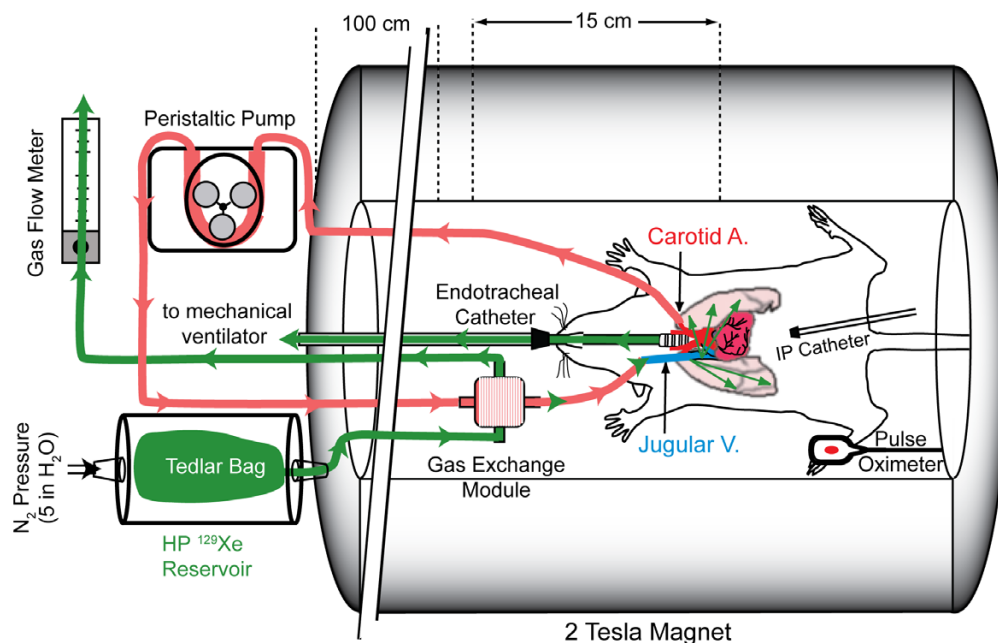


Figure 8-5 : Schéma représentant le dispositif permettant une infusion extracorporelle du xénon hyperpolarisé dans le système sanguin et les poumons du rat.¹⁴

En 2010, Driehuys et al. avaient élaboré un système de perfusion des poumons en utilisant la voie de l'injection intraveineuse.¹⁶ Pour ce procédé, le xénon est dissous dans une solution saline puis injecté dans la veine de la queue d'un rat (Figure 8-6).

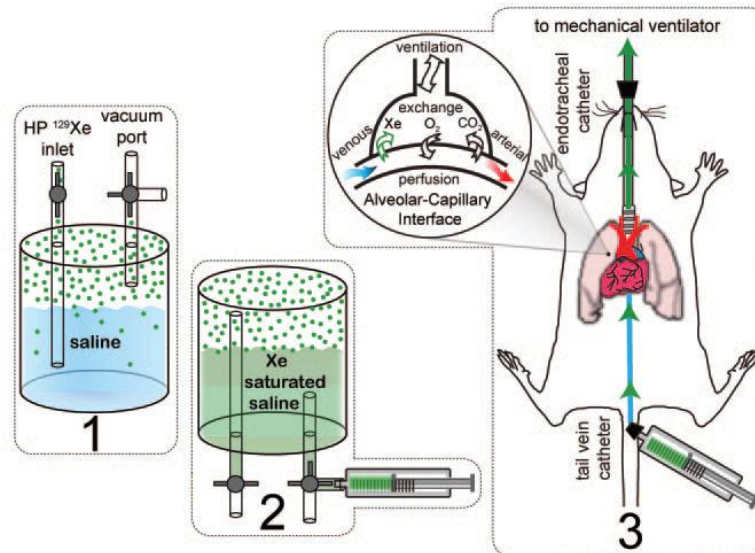


Figure 8-6 : Schéma représentant le dispositif permettant une injection intraveineuse du xénon hyperpolarisé dans la queue du rat pour atteindre le système sanguin et les poumons.¹⁶

8.3. Nos résultats préliminaires

8.3.1. Protocole et Instrumentation

La quantité de xénon hyperpolarisé préparée est de l'ordre de 10 ml à partir soit du montage de pompage optique à base de laser en plusieurs accumulations, soit du montage à base de diodes laser en un seul transfert. Il est stocké congelé (dans le tube en U ou le serpentin) et placé dans un champ magnétique de 5 kG. Il est transporté ainsi jusqu'à l'imageur de NeuroSpin qui est à 40 mètres du laboratoire (grâce au chariot décrit en Figure 3-9). Il est ensuite réchauffé dans le champ de fuite de l'aimant. Le transfert vers la seringue s'effectue au moyen d'une ligne à vide placée aussi dans le champ de fuite.

L'imageur utilisé est un Bruker Pharmascan 7T possédant des gradients de 760 mT/m et fonctionnant sous Paravision 5.1. Une antenne a été conçue et réalisée par Eric Giacomini (atelier de mécanique de NeuroSpin) ; celle-ci est de type cage d'oiseau, doublement accordée en proton (300,1 MHz) et en xénon 129 (83,08 MHz) d'un diamètre de 8 cm et de longueur 15,5 cm (Figure 8-7). Des systèmes de positionnement rapide de cette antenne au sein de l'aimant ont été fabriqués par Christian Chauvin et Louis Liagre (atelier de mécanique de l'IBITEC-S).

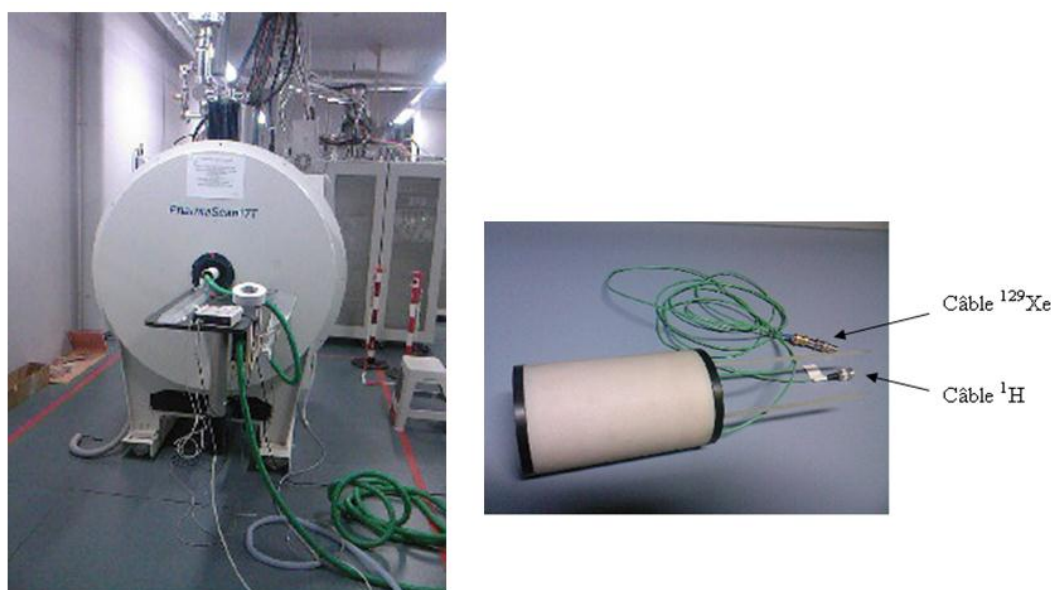


Figure 8-7 : Aimant de l'imageur 7 T et antenne double accord ^{129}Xe - ^1H utilisés à NeuroSpin.

Nos études ont toutes été faites sur des rats Sprague Dawley mâles de 250 à 300 g. Préalablement à l'introduction de xénon ces rats ont été anesthésiés par voie péritonéale avec un mélange Domitor®¹ à 0.35 $\mu\text{L/g}$ - Kétamine à 0.46 $\mu\text{L/g}$. Quinze minutes après ils étaient intubés, placés dans l'aimant et les images ^1H réalisées. Pour ces images, une synchronisation des séquences FLASH avec le rythme cardiaque de l'animal a été effectuée grâce à une sonde détectant les battements du cœur placée sur le lit de l'animal. Toutes les images et tous les spectres présentés ont été obtenus sur des rats vivants.

¹ Composition du Domitor : chlorhydrate de métédomidine, parahydroxybenzoate de méthyle et de propyl, chlorure de sodium

8.3.2. Tests sur le mode d'administration du xénon

8.3.2.1. Administration par injection

Le premier mode d'introduction du xénon testé est l'injection dans une solution biocompatible. Pour cela, nous avons utilisé des émulsions de perfluorocarbones qui sont inertes et ont la capacité de dissoudre non seulement O₂ ou CO₂, mais aussi le xénon. Des expériences ont mis en évidence l'allongement du temps de relaxation longitudinale du xénon dans le sang grâce à l'utilisation de ces composés. Les émulsions de PFOB (perfluorooctylbromure) dans lesquelles le xénon est très soluble et qui l'isole ainsi des espèces paramagnétiques présentes dans le sang et les tissus lui confèrent un T₁ suffisamment long (94 s) et semblent être de bons candidats.¹⁷

Pour la première expérience *in vivo*, nous avons donc injecté dans l'artère fémorale d'un rat une solution d'1 mL à 60% de PFOB dans un tampon PBS + DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine). Les images ¹H et ¹²⁹Xe sont données en Figure 8-8. D'après ces images, il semble que l'artère n'a pas été atteinte.

Les résultats obtenus avec une séquence FLASH ¹²⁹Xe n'ont pas été tout à fait ceux escomptés. Alors que nous craignons des artefacts et problèmes d'images floues liés à la diffusion rapide du xénon dans le flux sanguin (analogues à ceux rencontrés dans les techniques de sang noir), il s'est avéré qu'une zone très localisée a donné un signal pendant un temps assez long. Cela nous laisse envisager plusieurs hypothèses : création d'une poche de gaz ? stockage du xénon dans un muscle ?

Nous avons donc préféré nous tourner vers la seconde méthode d'administration du xénon.

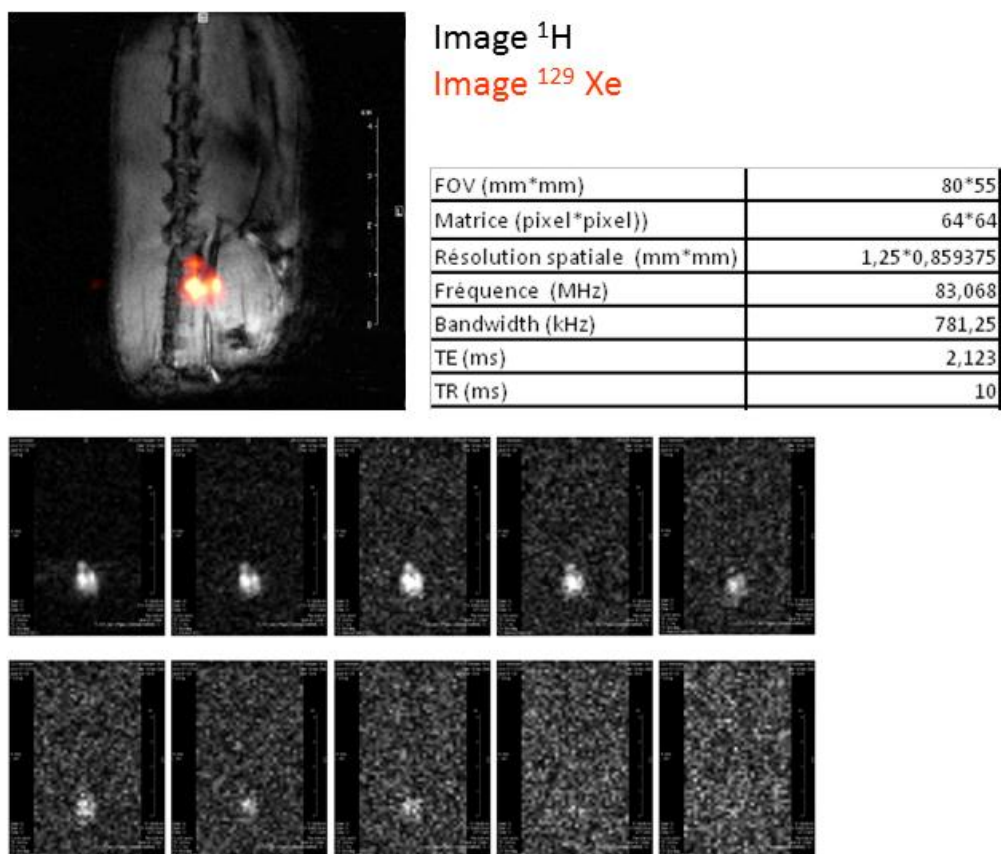


Figure 8-8 : Images sagittales à 7 T d'un rat après injection d'une solution de PFOB contenant du xénon hyperpolarisé dans la cuisse d'un rat. En haut à gauche, superposition de l'image ^1H et de l'image ^{129}Xe . En bas, suivi longitudinal de la relaxation du xénon 129 hyperpolarisé. La durée d'acquisition de chaque image est de 2,5 seconde et le nombre de scan est de 4.

8.3.2.2. Administration par inhalation

L'inhalation est la méthode la plus simple pour administrer un gaz à l'intérieur d'un être vivant. Nous avons utilisé pour notre deuxième expérience in vivo la méthode par inhalation, en adoptant la stratégie suivante : pour imager les poumons dans un premier temps on a intubé le rat anesthésié avec un cathéter 14-G (Braun) où l'on a administré le gaz hyperpolarisé via une seringue Hamilton étanche aux gaz (et ne comportant aucun composant métallique) reliée à l'entrée du cathéter par un système Luer lock (Figure 8-9).



Figure 8-9 : Seringue utilisée pour administrer le xénon par inhalation

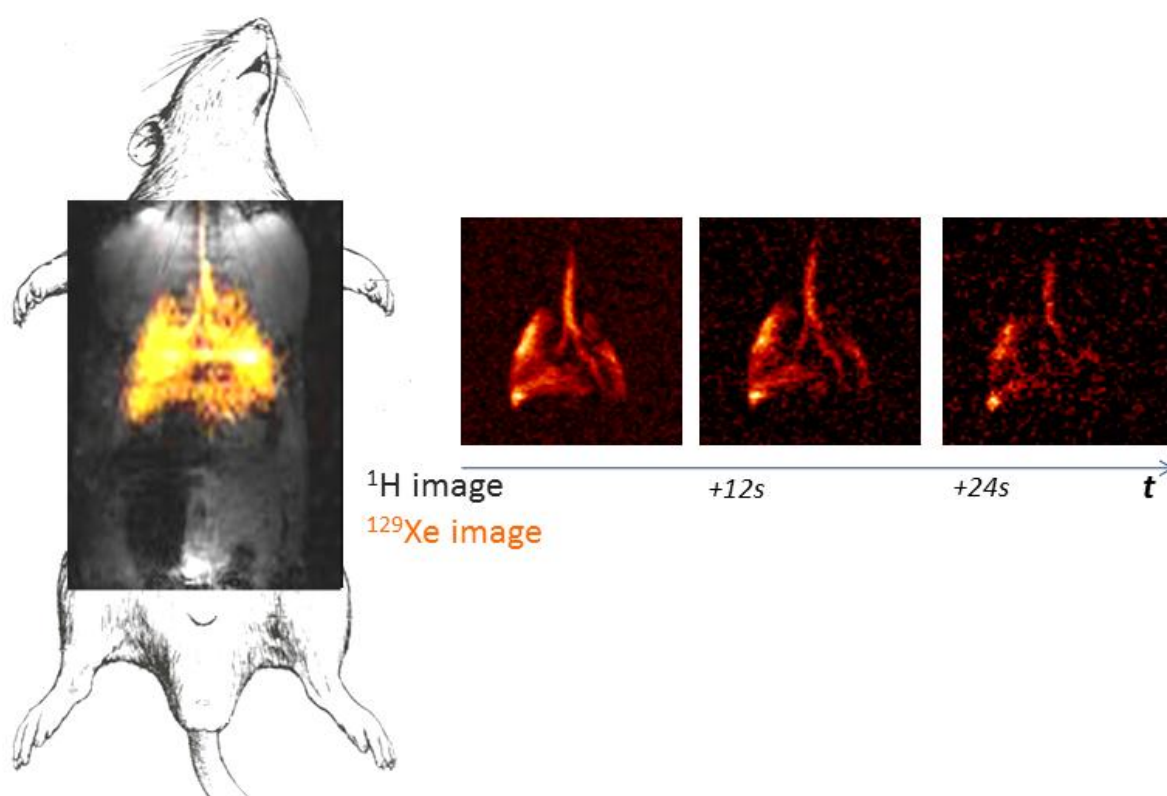


Figure 8-10 : Images coronales à 7 T des poumons de rat après inhalation de xénon hyperpolarisé (1 seul bolus de 2 mL). A gauche, superposition des images ^1H et ^{129}Xe (sans sélection de tranche). A droite, évolution du signal IRM ^{129}Xe au cours du temps (séquence FLASH). Pour ces dernières images, une tranche de 8 mm d'épaisseur a été sélectionnée. Chaque image a été réalisée en 10,2 s. Autres conditions expérimentales : voir texte.

Des images FLASH ^{129}Xe ont été réalisées après l'introduction du xénon (Conditions expérimentales : FOV 8 x 5,5 cm ; 128 x 64 points ; TE = 2,1 ms ; TR = 10 ms ; 8 scans) ; elles sont présentées en figure 8-10.

Elles nous permettent de distinguer avec une bonne résolution la trachée, les voies acheminant les gaz jusqu'aux poumons et les deux lobes pulmonaires.

8.3.3. Expériences avec un précurseur de biosonde

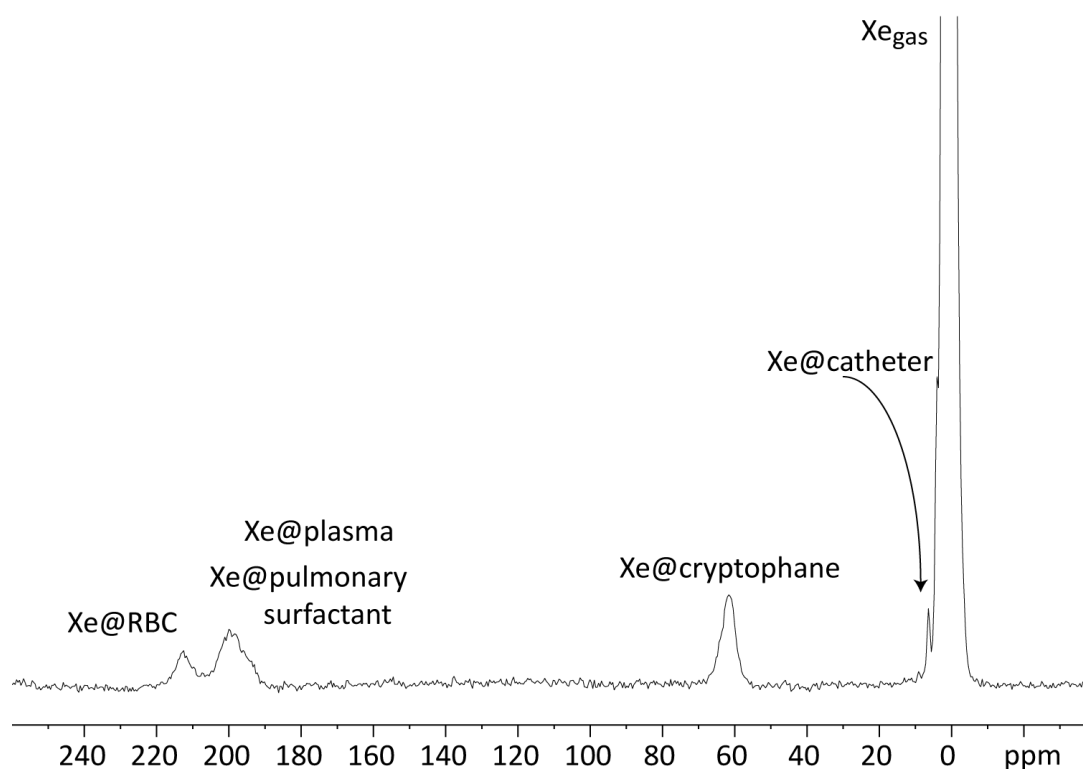


Figure 8-11 : Spectre RMN ^{129}Xe polarisé (à 7T) obtenu 15 minutes après l'instillation d'une solution aqueuse de cryptophane-222 hexa-carboxylate (5 mg dans 500 μL soit une concentration de 8.4 mM) dans les poumons d'un rat.

Le but de cette expérience a été de détecter un précurseur de biosonde dans le volume pulmonaire d'un rat vivant. La molécule a été introduite par instillation, puis le xénon a été administré par voie aérienne. Comme molécule (biosonde) modèle nous avons choisi le cryptophane-222 hexa-carboxylate, soluble dans l'eau (cf. Chapitre 5). Avec une solution à 8.4 mM, nous sommes capables de détecter en 1 scan le xénon encapsulé dans le

cryptophane, en plus des autres signaux correspondant au gaz (majoritaire), au xénon dans le plasma, la membrane pulmonaire et le sang (Figure 8-11).

Une autre expérience a consisté à utiliser une solution de concentration similaire en cryptophane et à réaliser une alternance de séquences RMN avec impulsion dure de faible angle de basculement couvrant toute la gamme spectrale, et de séquences utilisant une impulsion sélective en fréquence centrée sur le signal de xénon encapsulé (Figure 8-12). L'intérêt de cette expérience est le suivant : alors que sur le spectre obtenu avec impulsion dure, seuls les signaux du xénon gaz, du xénon dans le plasma et du xénon dans les globules rouge apparaissent sur le spectre, lorsqu'on utilise une impulsion sélective sur le signal de xénon encapsulé le signal de xénon encapsulé se maintient jusqu'à 60 secondes. Ceci prouve qu'un échange continu et rapide (bien que lent à l'échelle de la différence de déplacement chimique) existe entre la phase gaz et le xénon à l'intérieur de la molécule-cage. Ceci est très encourageant pour la suite des expériences, puisque cet échange pourra être mis à profit pour gagner en sensibilité de détection.

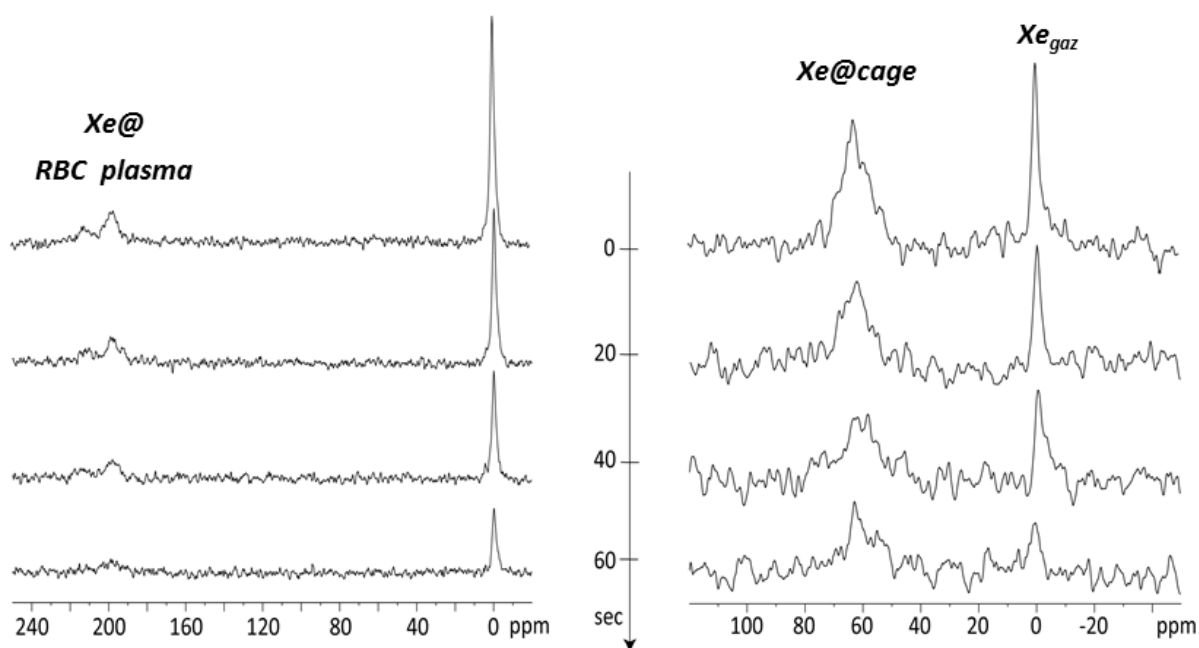


Figure 8-12: Spectres RMN ^{129}Xe hyperpolarisé réalisés *in vivo* après instillation de 500 μL d'une solution de cryptophane hexa-carboxylate à 8 mM. A gauche, spectres obtenus après une impulsion non sélective en fréquence de faible angle de basculement (1 scan) ; à droite, spectres obtenus après excitation sélective (Gaussienne 90° de 4 ms centrée sur le signal de xénon dans la cage du cryptophane, 32 scans). Au centre de la figure est indiqué l'écart en temps entre chaque spectre.

Nous avons ensuite tenté une expérience d'HyperCEST écho de gradient en utilisant le protocole suivant : le cathéter a cette fois été placé de manière à ce qu'il ne débouche que sur un poumon, et une solution contenant à la fois 1,5 micromole de cryptophane hexacarboxylate et un colorant, le bleu Evans (ce dernier est destiné à vérifier post-mortem qu'un seul poumon a été touché) a été administrée. Ensuite, après un délai de plusieurs dizaines de minutes (délai τ) le xénon polarisé est introduit par inhalation et la séquence IRM lancée.

Il est à noter tout d'abord que ce cryptophane est hydrophile, et donc il ne doit pas être déposé à l'interface air-tissu, mais plutôt avoir traversé la barrière pulmonaire et être dans le fluide alvéolaire. D'autre part, il n'a pas de ligand greffé et ne présente donc pas d'affinité particulière pour un site ou récepteur biologique donné. Cela signifie qu'il va se disperser sur toute la surface pulmonaire, ce qui n'est pas du tout idéal pour l'obtention d'un contraste sur l'image.

La figure 8-13 montre les images obtenues. Des problèmes de préparation et d'anesthésie du rat ont malheureusement impliqué un très grand délai τ entre l'instillation du cryptophane et l'inhalation du xénon hyperpolarisé, et le résultat n'est pas très concluant. La flèche rouge sur la photo indiquant la partie du poumon colorée semble correspondre au léger contraste négatif observé sur la différence des deux expériences avec saturation à la résonance (fréquence du xénon encapsulé dans le cryptophane) et avec saturation hors résonance, mais il n'est pas question de conclure définitivement.

Nous nous sommes cependant intéressés aux données RMN brutes, c'est-à-dire aux signaux de précession libre avant traitement (Figure 8-14).

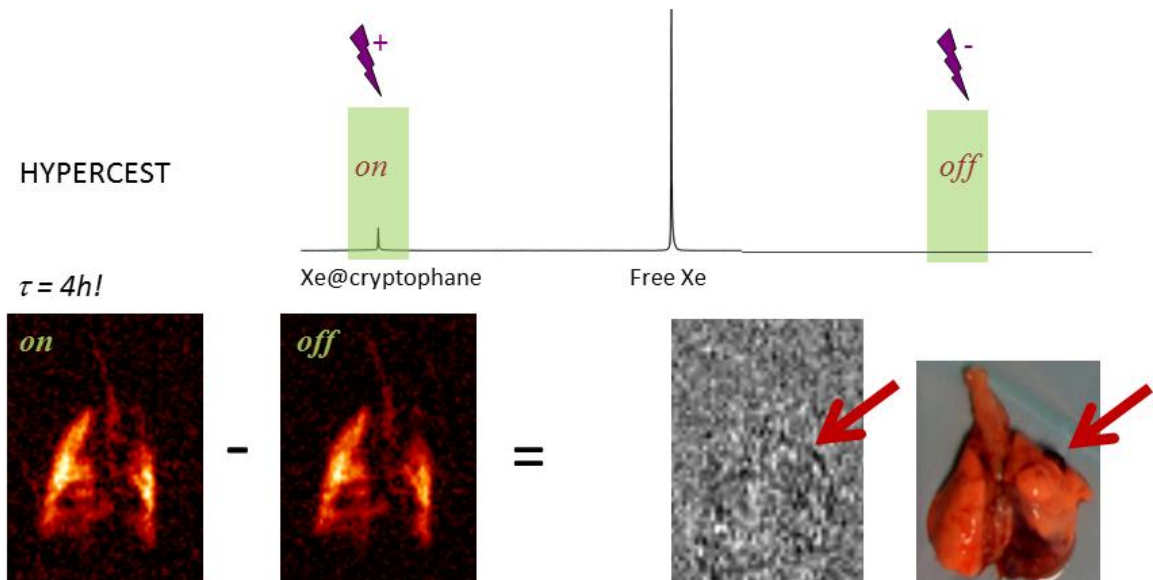


Figure 8-13 : Expérience d'HyperCEST écho de gradient (cf. chapitre 4). Dans cette expérience le cathéter a été introduit dans un poumon puis une solution de cryptophane (1,5 μmole) et de colorant a été instillée. Le xénon polarisé a été inhalé par le rat après un délai τ . Une alternance de saturation hors-résonance pendant 300 ms puis de saturation à la résonance pendant 300 ms a été réalisée pour chaque ligne de l'espace des k, fournissant les 2 images en bas à droite. La différence des 2 images est ensuite représentée, ainsi qu'une photo des poumons du rat après sacrifice de l'animal.

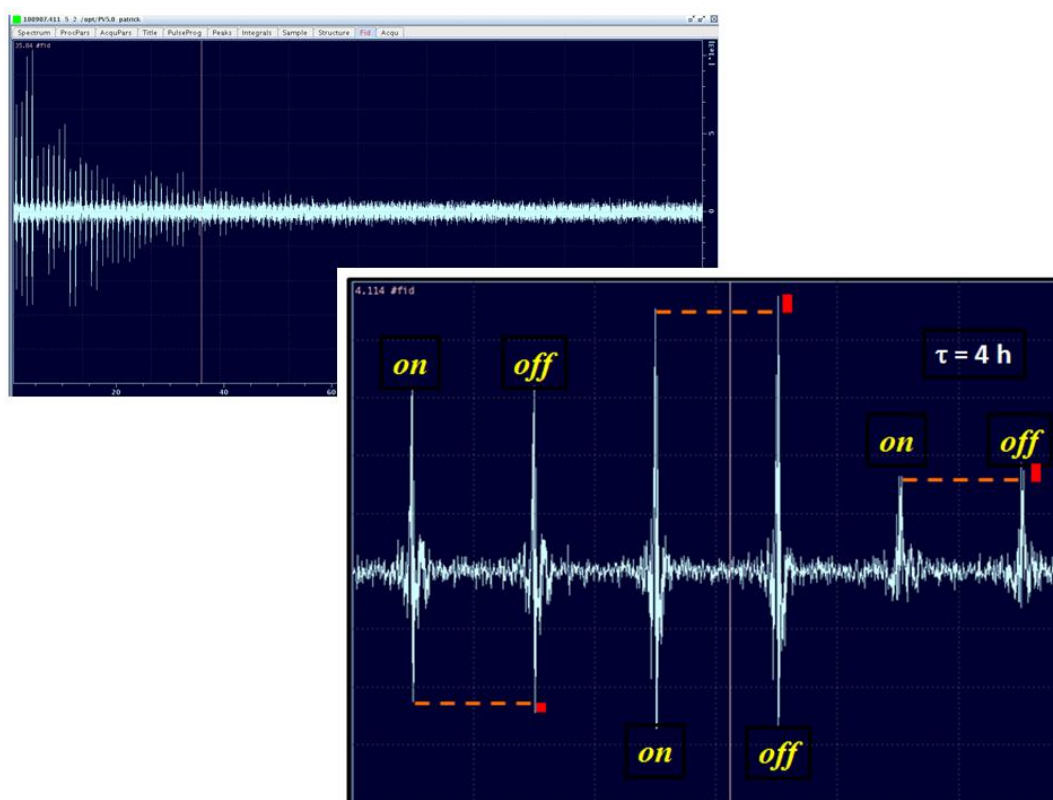


Figure 8-14: Signal de précession libre de l'expérience HyperCEST. En haut : interférogramme complet ; en bas : zoom sur les premiers échos. 'on' signifie saturation à la résonance (fréquence Xe@cryptophane), 'off' signifie saturation à une fréquence symétrique par rapport au signal de xénon gaz.

On peut remarquer sur ces données brutes que systématiquement l'écho après saturation hors-résonance est plus intense que l'écho après saturation à la résonance (fréquence du xénon encapsulé dans le cryptophane) pour la même ligne dans l'espace réciproque. Ceci est attendu, mais encourageant. Cela signifie que le xénon a bien atteint le cryptophane et qu'une saturation (de 300 ms) permet d'utiliser l'échange entrée-sortie du xénon pour détecter ce cryptophane.

Cette expérience demande à être poursuivie, ou mieux, les techniques d'HyperCEST-EPI que nous avons développées par la suite et qui semblent très performantes (cf. Chapitres 5 et 7) pourront être déployées. Ces résultats nous semblent toutefois déjà prometteurs, et l'utilisation de vraies biosondes destinées à cibler un récepteur biologique localisé, tel que cela est prévu, devrait nous faciliter encore le travail puisque le signal du xénon encapsulé sera concentré en une région précise du poumon.

REFERENCES

- (1) Albert, M. S.; Cates, G. D.; Driehuys, B.; Happer, W.; Saam, B.; Springer, C. S., Jr.; Wishnia, A. *Nature* **1994**, *370*, 199.
- (2) Kauczor, H.; Hofmann, D.; Kreitner, K.; Nilgens, H.; Surkau, R.; Heil, W.; Potthast, A.; Knopp, M.; Otten, E.; Thelen, M. *Radiology* **1996**, *201*, 564.
- (3) MacFall, J.; Charles, H.; Black, R.; Middleton, H.; Swartz, J.; Saam, B.; Driehuys, B.; Erickson, C.; Happer, W.; Cates, G.; Johnson, G.; Ravin, C. *Radiology* **1996**, *200*.
- (4) Salerno, M.; Altes, T.; Mugler, J.; Nakatsu, M.; Hatabu, H.; de Lange, E. *European Journal of Radiology* **2001**, *40*, 33.
- (5) Fain, S.; Schiebler, M.; McCormack, D.; Parraga, G. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2010**, *32*, 1398.
- (6) Branca, R. T.; Cleveland, Z. I.; Fubara, B.; Kumar, C. S. S. R.; Maronport, R. R.; Leuschner, C.; Warren, W. S.; Driehuys, B. *Proc Natl Acad Sci USA* **2010**, *107*, 3693.
- (7) Ruppert, K.; Brookeman, J. R.; Hagspiel, K. D.; Mugler, J. P., III *Magn. Reson. Med.* **2000**, *44*, 349.
- (8) Kitani, K. *Scand J Clin Lab Invest* **1972**, *29*, 167.
- (9) Weathersby, P.; Homer, L. *Undersea Biomed Res* **1980**, *7*, 277.
- (10) Driehuys, B.; Cofer, G. P.; Pollaro, J.; Mackel, J. B.; Hedlund, L. W.; A, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **2006**, *103*, 18278.
- (11) Dregely, I.; Mugler III, J.; Ruset, I.; Altes, T.; Mata, J.; Miller, G.; Ketel, J.; Ketel, S.; Distelbrink, J.; Hersman, F.; Ruppert, K. *J. Magn. Reson. Imag.* **2011**, *33*, 1052.
- (12) Driehuys, B. *Science* **2006**, *314*, 432.
- (13) Cleveland, Z.; Cofer¹, G.; Metz, G.; Beaver, D.; Nouns, J.; Kaushik, S.; Kraft, M.; Wolber, J.; Kelly, K.; McAdams, H.; Driehuys, B. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12192.
- (14) Cleveland, Z.; Möller, H.; Hedlund, L.; Nouns, J.; Freeman, M.; Qi, Y.; Driehuys, B. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31306.
- (15) Amor, N.; Zänker, P. P.; Blümmler, P.; Meise, F. M.; Schreiber, L. M.; Scholtz, A.; Schmiedeskamp, J.; Spiess, H. W.; Münnemann, K. *J. Magn. Reson.* **2009**, *201*, 93.
- (16) Driehuys, B.; Möller, H.; Cleveland, Z.; Pollaro, J.; Hedlund, L. *Radiology* **2009**, *252*, 386.
- (17) Goodson, B. M. *Conc. Magn. Reson.* **1999**, *11*, 203.

Chapitre 9

Conclusion et Perspectives

Chapitre 9 – Conclusion et Perspectives

Cette étude montre la diversité des recherches basées sur l'utilisation du xénon hyperpolarisé auxquelles j'ai participé. J'ai aussi pris part à quelques expériences concernant l'étude de xénon hyperpolarisé dissous en présence de suspensions de cellules. Dans ces applications le gaz rare est utilisé en tant que traceur, puisque l'on peut différencier les signaux extra- et intra-cellulaires sur le spectre RMN, et que des informations importantes telles que la perméabilité membranaire ou la présence de toxiques peuvent être obtenues.¹ Une application récente permet la différenciation des cellules sensibles et résistantes à la chimiothérapie.²

Durant ma thèse je me suis particulièrement impliquée dans le développement d'un montage de pompage optique à partir de diodes laser. Nous avons mis au point le montage et réalisé les premières expériences de polarisation du xénon en grande quantité. Avec ce nouveau dispositif nous avons pu obtenir une quantité de xénon de 12 ml en moins de 5 minutes avec une polarisation d'environ 25%. La production de xénon en plusieurs accumulations à la sortie de ce montage a également été rendue possible. L'exposé qui en a été fait dans ce mémoire a tenté de mettre en avant les différents aspects, scientifiques et techniques, qui nous sont apparus importants pour la réussite de ce projet. Nous avons également souhaité laisser une place à une approche théorique afin de maîtriser la compréhension du phénomène, l'objectif étant d'aboutir à un montage en flux continu de xénon pour disposer de quantités confortables pour le passage à l'*in vivo*. Au cours de ce travail, j'ai pu acquérir une assez bonne maîtrise de la technique de production de xénon hyperpolarisé par pompage optique. Il nous a fallu résoudre un certain nombre de problèmes pratiques relatifs au montage haute pression tel que nous l'avons envisagé (étanchéité, oxydation du rubidium, problème de reproductibilité, etc.). Le développement de ce dispositif a suscité beaucoup de créativité. Nous avons mis au point de nombreuses réalisations techniques sur mesure (serpentin avec deux voies d'entrée et deux voies de sortie, tube RMN avec un système de refroidissement intégré, cache faisceau, cache d'arrêt du rayonnement lumineux à la fin du montage...). Ce montage pourrait encore être amélioré

par exemple en affinant la largeur de raie en utilisant des réseaux holographiques de Bragg, ou en adaptant la géométrie de la cellule de pompage aux faisceaux incidents (forme et amplitude). Une cellule avec des cylindres de verres « jumelés » parallèles pourrait utiliser au mieux les deux faisceaux en sortie du polariseur circulaire.

Pour obtenir une production de xénon en flux continu une optimisation est nécessaire au niveau du circuit conduisant les différents gaz à l'entrée et à la sortie de la cellule de pompage optique. L'étape suivante consistera à rendre le système facilement déplaçable, ce qui nous permettrait de produire le gaz hyperpolarisé à proximité de laboratoires d'IRM distants du nôtre. Disposer du montage optique près de l'aimant pourrait de plus minimiser de façon conséquente les pertes de polarisation du xénon. Un projet de montage optique mobile, transportable par camionnette, est actuellement envisagé par le laboratoire. Ceci pourrait permettre de multiplier les collaborations avec des laboratoires ou hôpitaux.

Travailler avec le xénon a été une expérience enrichissante. Ce gaz noble possède des propriétés extraordinaires. Facilement hyperpolarisable par pompage optique, le xénon offre une augmentation spectaculaire de la sensibilité en RMN et en IRM. Une autre grande qualité du xénon est sa sensibilité hors du commun à son environnement ce qui se traduit par une grande variabilité des paramètres RMN (déplacement chimique, temps de relaxation, ...), ce qui permet une large gamme d'applications physico-chimiques, biologiques et médicales.

Bien que dans certains environnements (tels le sang etc.) l'aimantation xénon hors équilibre soit détruite assez rapidement par relaxation longitudinale et les impulsions radiofréquences utilisées dans les séquences RMN, il faut se rappeler que le gain initial est énorme (jusqu'à 75000 pour nos travaux en IRM à 7T) et que l'enjeu est 'simplement' d'utiliser l'hyperpolarisation transitoire de manière optimale. Ceci nous a poussés à relever de nouveaux défis, à la fois dans le domaine de développement de séquences RMN/IRM, dans la conception de systèmes hôtes du xénon polarisé optimisés, et dans la mise en place de protocoles adaptés.

Une difficulté rencontrée avec le xénon est cependant qu'il ne transfère que très difficilement sa polarisation vers d'autres noyaux. Pourtant, si l'on était capable d'avoir un

gain de signal provenant du xénon sur d'autres noyaux plus représentés dans les biomolécules (^1H , ^{13}C , ^{31}P , etc.), nous serions d'une part capables de suivre des métabolites *in vivo* et d'autre part peut-être de créer des états singulets à durée de vie longue.³ Nous avons tenté sans succès différents modes de transfert de polarisation du xénon sur d'autres noyaux tels le ^{13}C , par exemple par mélange thermique en phase solide. Mis à part les transferts de polarisation passant par voie de relaxation dipolaire croisée qui demandent une affinité chimique (SPINOE sur le proton), nous n'avons pas pu observer de transfert de polarisation global sur un système moléculaire. L'application immédiate et unique du xénon hyperpolarisé reste donc son utilisation comme traceur : seul ce noyau est localisé.

Grâce à la collaboration avec nos collègues de l'ENS Lyon et de la Direction des Sciences du Vivant à Saclay, nous avons tiré profit des propriétés physico-chimiques du xénon pour étudier et évaluer de nouveaux systèmes moléculaires hôtes du gaz hyperpolarisé à travers différentes expériences RMN. Des travaux visant à la compréhension de la dynamique interne de nouveaux cryptophanes et la cinétique d'entrée-sortie du gaz rare ont été entrepris en combinant des expériences RMN à la modélisation moléculaire.

J'ai ensuite participé à l'étude de différentes biosondes.

Je me suis intéressée à une sonde IRM ^{129}Xe destinée à la détection des ions Zn^{2+} , d'importance vitale pour l'organisme. D'autres cations métalliques plus toxiques pour l'homme ont également été ciblés. Alors que la concurrence s'intéresse massivement à la détection de récepteurs biologiques, nous avons préféré nous intéresser à un concept de sonde activable ciblant les ions libres et mobiles. Ce principe est comparable à celui des agents de contraste au gadolinium dans lesquels, lorsque la cible est détectée, une relaxivité importante est induite. Dans le cas de notre biosonde, lorsque la cible est détectée, une variation de déplacement chimique du xénon encapsulé est induite. Grâce à notre approche, nous sommes parvenus à gagner plusieurs ordres de grandeur en sensibilité par rapport aux agents de contraste IRM récents. Sur ce concept de sonde activable, plusieurs autres systèmes ou événements biologiques pourraient être ciblés. Une méthodologie adaptée pour l'imagerie multiplexée (imagerie simultanée de plusieurs biosondes) y a été associée.

Les travaux sur la détection de récepteurs transferrine représentent une avancée importante dans le domaine des biosondes. L'endocytose a été détectée et suivie pour la

première fois. Des problèmes de manque de spécificité de l'interaction biosonde-récepteur ont été rencontrés ; néanmoins des solutions faisant appel aux développements de cryptophanes rendus hydrophiles sont en cours. Lors de cette étude, un mode de greffage non spécifique de plusieurs cryptophanes sur une grosse protéine globulaire a aussi pu être réalisé. Il est en effet primordial pour améliorer le concept de biosonde, et en particulier sa sensibilité, de développer des systèmes augmentant la densité locale de xénon. L'équipe de Pines a notamment envisagé des systèmes de capsides, véhiculant jusqu'à 2700 molécules hôtes du xénon.^{4,5} Au laboratoire des études combinant des nanoparticules de silice poreuse avec des cryptophanes greffés en surface sont entreprises (collaboration avec l'IEM Montpellier).

Toutes ces études nous ont permis d'entreprendre le passage à l'*in vivo* sur un modèle petit animal. Les résultats obtenus utilisant le xénon hyperpolarisé que nous avons produit et les séquences que nous avons développées sont très encourageants. Nous avons obtenus des spectres RMN ^{129}Xe prouvant l'encapsulation du xénon dans le cryptophane localisé dans les cavités pulmonaires du rat. La preuve de concept *in vivo* en IRM n'est pas loin d'être réalisée. Pour y parvenir, les techniques que nous avons mises au point pour réaliser l'inhalation du xénon hyperpolarisé et l'instillation du cryptophane dans les poumons du rat sont à optimiser. L'utilisation d'un ventilateur synchronisé sur la respiration du rat qui permettrait de délivrer le xénon de façon automatisée et continue manque à ce jour pour aller plus loin dans nos applications *in vivo*.

Quant à l'objectif final, qui est de suivre une pathologie grâce à notre approche et tous les outils développés, il est à portée de main. Le suivi à long terme de l'évolution d'une cible biologique, pourrait être réalisé grâce à une simple introduction (répétée ou continue) de xénon hyperpolarisé après qu'une biosonde ait été préalablement introduite.

L'IRM du xénon 129 hyperpolarisé est donc bel et bien un domaine très prometteur qui offre un potentiel énorme pour révolutionner l'imagerie dans le domaine du vivant.

REFERENCES

- (1) Boutin, C.; Desvaux, H.; Carrière, M.; Leteurtre, F.; Jamin, N.; Boulard, Y.; Berthault, P. *NMR Biomed.* 2011, *24*, 1.
- (2) Boutin, C.; Tassali, N.; Berthault, P. Manuscrit en préparation.
- (3) Levitt, M. H. *Encyclopedia of Magnetic Resonance* 2010.
- (4) Meldrum, T.; Seim, K.; Bajaj, V.; Palaniappan, K.; Wu, W.; Francis, M.; Wemmer, D.; Pines, A. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 5936.
- (5) Stevens, T.; Palaniappan, K.; Ramirez, M.; Francis, M.; Wemmer, D.; Pines, A. *Magn. Reson. Med.* 2012, 1.

Publications auxquelles j'ai participé pendant ma thèse

ARTICLES

1) Cell uptake of a biosensor detected by hyperpolarized ^{129}Xe NMR: the transferrin case

C. Boutin, A. Stopin, F. Lenda, T. Brotin, J.-P. Dutasta, N. Jamin, A. Sanson, Y. Boulard, F. Leteurtre, G. Huber, A. Bogaert-Buchmann, N. Tassali, H. Desvaux, M. Carrière, and P. Berthault
Bioorganic and Medicinal Chemistry (2011) DOI: 10.1016/j.bmc.2011.05.002

2) Design and Synthesis of New Cryptophanes with Intermediate Cavity Sizes

N. Kotera, L. Delacour, T. Traoré, N. Tassali, P. Berthault, D. Buisson, J. Dognon and B. Rousseau
Organic Letters (2011) DOI: 10.1021/ol2005215

3) The first metal-free water-soluble cryptophane-111

T. Traoré, G. Clavé, L. Delacour, N. Kotera, P.-Y. Renard, A. Romieu, P. Berthault, C. Boutin, N. Tassali and B. Rousseau
Organic Letters (2011) DOI: 10.1021/ol2005215

4) A Sensitive Zinc-Activated ^{129}Xe MRI Probe

N. Tassali, N. Kotera, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert and B. Rousseau
Angewandte Chemie (2012) DOI: 10.1002/anie.201109194

5) Multiplexed detection of metal ions using hyperpolarized ^{129}Xe MRI (titre provisoire)

N. Tassali, N. Kotera, E. Léonce, C. Boutin, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert, B. Rousseau and P. Berthault
Manuscrit en préparation

6) Detection of Cells Resistant to Chemotherapy through Hyperpolarized ^{129}Xe Nuclear Magnetic Resonance

C. Boutin, N. Tassali, P. Berthault
Manuscrit en préparation

COMMUNICATIONS ORALES

1) MRI biosensors based on hyperpolarized xenon

N.Tassali, C. Boutin, G. Huber, H. Desvaux, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brotin, L.Ciobanu, A. Pavilla, Y. Boulard, N. Jamin and P. Berthault.

Journée annuelle des doctorants du CEA, Juin 2010, CEA, Saclay, France

2) Biosensors using laser-polarized ^{129}Xe NMR

N.Tassali, C. Boutin, G. Huber, H. Desvaux, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brotin, L.Ciobanu, A. Pavilla, Y. Boulard, N. Jamin and P. Berthault.

GERM (Groupe d'Etude de Résonance Magnétique), Mai 2011, Sitges, Espagne

3) Detection of ions thanks to a biosensor using hyperpolarized ^{129}Xe

N.Tassali, C. Boutin, G. Huber, H. Desvaux, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brotin, L.Ciobanu, A. Pavilla, Y. Boulard, N. Jamin and P. Berthault.

Journée annuelle des doctorants du CEA, Juin 2010, CEA, Saclay, France

4) A Sensitive Zinc-Activated ^{129}Xe MRI Probe

N. Tassali, N. Kotera, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert and B. Rousseau.

Réunion "Fait marquant" du Service Interdisciplinaire sur les Systèmes Moléculaires et les Matériaux du CEA, Mars 2012, CEA, Saclay, France

5) Une nouvelle sonde pour la détection ultra-sensible du zinc par IRM

N. Tassali, N. Kotera, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert and B. Rousseau.

Journée annuelle des doctorants de l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, Avril 2012, Versailles, France

6) Détection d'ions métalliques par IRM du xénon hyperpolarisé

N. Tassali, N. Kotera, E. Léonce, C. Boutin, P. Berthault, T. Brotin, J.-P. Dutasta, L. Delacour, T. Traoré, D.-A. Buisson, F. Taran, S. Coudert and B. Rousseau.

Journée du Grand Bassin Parisien, Juin 2012, Versailles, France

COMMUNICATIONS POSTERS

1) MRI biosensors based on hyperpolarized xenon

N.Tassali, C. Boutin, G. Huber, H. Desvaux, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brodin, L.Ciobanu, A. Pavilla, Y. Boulard, N. Jamin and P. Berthault.

GERM (Groupe Français d'Etude de Résonance Magnétique), Avril 2010, Saint-Die-des-Vosges, France

2) Biosensors using laser polarized ^{129}Xe NMR

N.Tassali, C. Boutin, G. Huber, H. Desvaux, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brodin, L.Ciobanu, A. Pavilla, Y. Boulard, N. Jamin and P. Berthault.

GERM, Mai 2011, Sitges, Espagne

3) Toward molecular imaging using ^{129}Xe NMR-based biosensors

N.Tassali, C. Boutin, G. Huber, H. Desvaux, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brodin, L.Ciobanu, A. Pavilla, Y. Boulard, N. Jamin and P. Berthault.

4) Applications biologiques du ^{129}Xe hyperpolarisé

N.Tassali, C. Boutin, E. Léonce, A. Stopin, J-P. Dutasta, T. Brodin and P. Berthault.

Journées « Plasticité et Intégrité du Génome (PIG) », 17-18 Novembre 2011, Neurospin, Saclay, France